

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Fakulta metalurgie a materiálového inženýrství

# DISERTAČNÍ PRÁCE

Ostrava 2017

Ing. Magda Reli, DiS.

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Fakulta metalurgie a materiálového inženýrství

## DISERTAČNÍ PRÁCE

2017

### **Organo-anorganické hybridní materiály s antibakteriálními vlastnostmi**

*Organo-inorganic hybrid materials with antibacterial properties*

Autor práce: Ing. Magda Reli, DiS.

Studijní program: Materiálové vědy a inženýrství

Školitel: RNDr. Marta Valášková, DSc.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: **Ing. Magda Reli, DiS.**

Název disertační práce: **Organo-anorganické hybridní materiály s antibakteriálními vlastnostmi**

Název disertační práce anglicky: ***Organo-inorganic hybrid materials with antibacterial properties***

Fakulta: **Fakulta metalurgie a materiálového inženýrství**

Studijní obor: **Materiálové vědy a inženýrství**

Školitel: **RNDr. Marta Valášková, DSc.**

Konzultant: **Ing. Sylva Holešová, Ph.D.**

Datum obhajoby: 28. 6. 2017

Klíčová slova česky: **vermikulit, interkalace, chlorhexidin diacetát, antibakteriální účinnost**

Klíčová slova anglicky: **vermiculite, intercalation, chlorhexidine diacetate, antibacterial activity**

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Ostravě dne .....

.....

Vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě vyjádřila poděkování mé školitelce RNDr. Martě Valáškové, DSc. za odborné a vstřícné vedení této disertační práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat mé konzultantce Ing. Sylvě Holešové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a všestrannou pomoc.

Zvláštní poděkování patří RNDr. Erichu Pazdziorovi ze Zdravotního ústavu v Ostravě za vyhodnocování antibakteriální účinnosti mých vzorků a poskytnuté konzultace.

Nakonec poděkování největší patří mé rodině, především pak mému manželovi za jejich trpělivost a podporu, kterou mi věnovali během studia.

*Tato práce vznikla ve spolupráci s IT4Innovations Centra Excellence projekt reg. č. CZ.1.05/1.1.00/02.0070; a za finanční podpory projektů MŠMT SP2011/158, SP2012/43 a projektu GAČR 210/11/2215.*

## Abstrakt

Předložená disertační práce se zabývá přípravou a charakterizací organo-anorganických hybridních materiálů, jež vykazují antibakteriální účinnost.

Hlavní anorganickou složku těchto materiálů tvoří jílový minerál vermikulit. Organická část je pak zastoupena antibakteriální organickou látkou chlorhexidinem diacetátem, jehož interkalací do struktury vermikulitu byly následně připraveny vzorky hybridních materiálů.

Práce shrnuje výsledky čtyř hlavních studií, během kterých byla studována antibakteriální účinnost monoionních forem vermikulitů a z nich následně připravených organovermikulitů, dále vliv úpravy povrchu výchozího minerálu vermikulitu na antibakteriální účinnost připravených organovermikulitů, a také byla hodnocena stabilita aktivní antibakteriální složky (chlorhexidinu) na jílovém nosiči za různých podmínek. Poslední studie byla zaměřena na přípravu vzorků uplatitelných v praxi. Práškové organo-anorganické hybridní vzorky byly použity pro přípravu polyethylenových nanokompozitů.

Jednotlivé vzorky byly charakterizovány následujícími metodami, především rentgenovou práškovou difrakční analýzou, infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací, skenovací elektronovou mikroskopií, a také stanovením celkového organického uhlíku při sledování stability chlorhexidinu ve vzorcích. Nakonec byla u všech vzorků testována antibakteriální účinnost.

Obsahem teoretické části je charakterizace struktur jílových materiálů, jejich klasifikace a popis postupů modifikací spolu s postupy antibakteriálního testování s popisem klinicky významných bakteriálních kmenů. Teoretická část je doplněna literárními publikovanými údaji o antibakteriálních organojílech a nanokompozitních materiálech.

Výsledkem laboratorních pokusů jsou velmi důležité poznatky v oblasti přípravy vzorků s antibakteriálním účinkem. Výsledky antibakteriálních testů všech připravených vzorků organovermikulitů potvrdily jejich antibakteriální vlastnosti, i když vzhledem k velice specifickému chování jednotlivých bakterií, jsou podmínky, při kterých je jejich bakteriální růst inhibován, značně rozdílné. Výsledkem je proto odlišný účinek vzorku vzhledem k individuálním bakteriálním kmenům. Pozitivním zjištěním byl minimální úbytek chlorhexidinu z matrice vermikulitu za zvolených podmínek a zároveň téměř neměnná antibakteriální aktivita, což svědčí o velké stabilitě těchto kompozitů. Rovněž polyetylenové nanokompozitní vzorky vykazovaly dlouhodobou antibakteriální účinnost, což potvrdilo představu o využití těchto materiálů při výrobě hmot s antibakteriálním efektem.

*Klíčová slova:* vermikulit, interkalace, chlorhexidin diacetát, antibakteriální účinnost

## Abstract

This thesis is dealing with the preparation and characterization of organo-inorganic hybrid materials which display antibacterial activity.

The clay mineral vermiculite is the main inorganic component of these materials. The organic part is represented by an organic antibacterial agent chlorhexidine diacetate. Samples of hybrid materials were prepared by intercalation of chlorhexidine into vermiculite's structure.

This work summarizes the results of four main studies during which the antibacterial activity of monoionic forms of vermiculite and their subsequently prepared organovermiculites were tested, further the influence of surface treatment of the original vermiculite on antibacterial effect of organovermiculites was studied and efficiency of ion exchange reaction of vermiculite or stability investigation of the active antibacterial component (chlorhexidine) under various conditions were also determined. The last study was focused on the preparation of samples applicable in practice. The organo-inorganic powder hybrid samples were used for the preparation of nanocomposites in the polyethylene matrix.

Samples from the individual studies were characterized by various methods, such as X-ray powder diffraction, infrared spectrometry with Fourier transformation, scanning electron microscopy, or the determination of total organic carbon when the stability of chlorhexidine in the samples was monitored. All samples were tested for their antibacterial activity.

The theoretical part of the PhD thesis is addressing to the basic description of the clay materials structure, their classification and description of modifications along with antibacterial testing and description of clinically significant bacterial stems. The theoretical part also includes background research dealing with antibacterial organoclays and nanocomposite materials. The entire series of experiments resulted in very important insights for the future preparation of samples with antibacterial effect. The antibacterial tests confirmed antibacterial activity of all prepared organovermiculite samples, nevertheless, regarding the very specific behavior of individual bacteria the conditions inhibiting the bacterial growth substantially varies for each sample toward each bacteria stem. Therefore, the result is varying effect of the sample towards individual bacterial stems. The very important finding was the chlorhexidine outflow is negligible and has minimal effect on the resulting antibacterial effect which indicates large stability of the composites. Also the polyethylene nanocomposite samples showed longterm antibacterial activity which confirmed the idea of utilizing these materials at the production of substances with antibacterial effect.



*Keywords:* vermiculite, intercalation, chlorhexidine diacetate, antibacterial activity

# OBSAH

1	ÚVOD.....	3
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	5
2.1	Jílové minerály .....	5
2.1.1	Struktura a klasifikace vrstevnatých fylosilikátů.....	6
2.1.2	Vybrané charakteristiky vrstevnatých fylosilikátů .....	12
2.1.3	Modifikace vrstevnatých fylosilikátů .....	14
2.2	Vermikulit.....	20
2.3	Chlorhexidin .....	23
2.4	Kompozitní materiály .....	27
2.4.1	Jílové polymerní nanokompozitní materiály .....	28
2.5	Antibakteriální testování.....	31
2.5.1	Bakterie - <i>obecně</i> .....	31
2.5.2	Kultivace bakterií .....	33
2.5.3	Klinicky významné bakteriální kmeny .....	34
2.5.4	Mechanismus antibakteriálního působení organo-jílového materiálu.....	37
2.6	Organo - anorganické hybridní materiály s antibakteriálními vlastnostmi .....	38
2.6.1	Stabilita chlorhexidinu v organo-jílovém kompozitu.....	40
2.6.2	Organo-jílové nanokompozitní polymerní materiály s antibakteriálními účinky .....	41
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	43
3.1	Vstupní materiály .....	43
3.2	Metody identifikace a jejich přístroje .....	43
3.2.1	Rentgenová prášková difrakční analýza .....	44
3.2.2	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací .....	44
3.2.3	Skenovací elektronová mikroskopie.....	44
3.2.4	TOC analýza .....	45
3.2.5	Antibakteriální testy .....	45
3.3	Antibakteriální účinnost organovermikulitů připravených z iontově-vyměňených vermikulitů .....	48
3.3.1	Příprava vzorků .....	48

3.3.2	Charakterizace monoionních vermikulitů a organovermikulitů .....	49
3.3.3	Vyhodnocení antibakteriální účinnosti monoionních vermikulitů a z nich připravených organovermikulitů .....	53
3.3.4	Diskuze .....	55
3.4	Vliv mechanické a chemické úpravy vermikulitu na výslednou antibakteriální účinnost připravených organovermikulitů .....	57
3.4.1	Příprava vzorků .....	57
3.4.2	Charakterizace mechanicky a chemicky modifikovaných vermikulitů a organovermikulitů .....	58
3.4.3	Vyhodnocení antibakteriální účinnosti mechanický a chemicky modifikovaných vermikulitů a z nich připravených organovermikulitů .....	63
3.4.4	Diskuze .....	64
3.5	Stabilita antibakteriálního nanokompozitu chlorhexidin/vermikulit .....	66
3.5.1	Příprava vzorků .....	66
3.5.2	Charakterizace organovermikulitů po testu stability .....	67
3.5.3	Vyhodnocení antibakteriální účinnosti organovermikulitů po testu stability .....	70
3.5.4	Diskuze .....	71
3.6	Nanokompozity polymer/organovermikulit s antibakteriálním účinkem .....	75
3.6.1	Příprava vzorků .....	75
3.6.2	Charakterizace organovermikulitových polymerních nanokompozitů .....	77
3.6.3	Vyhodnocení antibakteriální účinnosti organovermikulitových polymerních materiálů .....	83
3.6.4	Diskuze .....	86
4	ZÁVĚR .....	90
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	93
6	SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ .....	103
7	SEZNAM TABULEK .....	107
8	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	108
9	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	111

# 1 ÚVOD

Jedním ze základních materiálů, které lidstvo využívá již od nepaměti, jsou jílové minerály. V Japonsku byly nalezeny úlomky hliněného nádobí, které se datují k roku 14 000 p. n. l. Jílové nebo také hliněné destičky sloužily jako první materiál, na který se dalo psát. Jíl byl také nedílnou součástí stavebních materiálů.

Postupem času, s modernizací přístrojů a rozvojem vědy se lidstvo začalo zajímat o samotnou strukturu materiálů. Mnohé materiály se snažili synteticky vyrobit, nebo také vylepšit. Tak začaly vznikat hybridní materiály, které v sobě kombinují anorganické a organické sloučeniny, přičemž jejich vhodnou kombinací můžeme dosáhnout nových unikátních vlastností konečného materiálu. Důležitou vlastností jílových minerálů je jejich schopnost relativně snadno přijmout anorganické nebo organické látky do své struktury. Další neméně významnou předností je jejich nízká cena ve srovnání s cenou jiných látek obdobných vlastností. Spolu s rozvojem charakterizačních technik činí tyto vlastnosti z jílových minerálů materiál s velmi bohatým využitím a slibnou budoucností.

Jílové minerály jsou v posledních letech hojně studovány pro aplikace v medicíně, zejména pro jejich schopnost přijmout do své struktury cizí látku, sloužící jako nosič léčiv, které umožňují jejich postupné uvolňování. Další velmi významnou vlastností jílových minerálů je jejich schopnost exfoliace ve formě nanočástic v polymerní matici, čímž vznikne zcela nový nanokompozitní materiál se zlepšenými vlastnostmi. Právě nanokompozitní materiály, v nichž se snoubí různé druhy materiálů, přičemž jejich výhody v sobě kombinují a nevýhody naopak potlačují, zaujímají v dnešní době prvenství v oblastech elektroniky, konstrukčních materiálech, farmacii i jako selektivní sorbenty či katalyzátory. Praktických využití jílových minerálů a jejich modifikací je nespočet, což je také způsobeno jejich nízkou cenou a relativně snadnou dostupností.

Celá skupina hybridních organo-anorganických materiálů hraje důležitou roli v rozvoji pokrokových funkčních materiálů. Výzkum těchto hybridních organo-anorganických materiálů je rozšířen celosvětově a vědci využívají každé příležitosti k vytvoření nových moderních materiálů, v nichž se snoubí tři vědní oblasti: anorganická, organická i biologická.

Disertační práce se zabývá laboratorní přípravou a charakterizací antibakteriálních organo-anorganických hybridních materiálů. Cílem této disertační práce je zhodnocení výsledků studia o antibakteriálních účincích připravených materiálů na bázi jílového minerálu vermikulitu. Vermikulit byl modifikován ve funkci hostitele na organovermikulit postupem

interkalace antibakteriální sloučeninou chlorhexidinem (hostem) za účelem přípravy antibakteriálního materiálu s velkým povrchem a cenovou dostupností, který vykazuje dlouhodobé antibakteriální působení.

Cíle zadané k řešení disertační práce jsou rozděleny do čtyř částí:

- První část práce se zabývá vlivem iontovýměnné reakce výchozího vermikulitu na intenzitu antibakteriální účinnosti připravených organovermikulitů.
- Druhá část práce se věnuje zhodnocení vlivů mechanických a chemických úprav na změnu strukturních vlastností vermikulitu a dále hodnotí vliv těchto úprav na antibakteriální účinnost následně připravených organovermikulitů
- Třetí část práce přináší zhodnocení stability molekul chlorhexidinu ve vzorcích připravených organovermikulitů.
- Čtvrtá část práce se zabývá přípravou a charakterizací antibakteriálních nanokompozitních jílových materiálů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Jílové minerály

Jílové minerály jsou v přírodě takřka všudypřítomné. Tvoří nejdůležitější skupinu půdních sekundárních minerálů, které jsou podstatnou součástí půd a sedimentárních hornin (jíly, jílovce, jílové břidlice a mnohé další). Mezi jílové minerály patří nejen všechny fylosilikáty (vrstevnaté minerály), ale také další minerály, jako například minerály skupiny alofanu, či některé hydroxidy, oxy-hydroxidy a oxidy [1].

Jílové minerály vznikají rozpadem primárních minerálů (křemen, živec) nebo reakcí produktů, které se při zvětrávání těchto minerálů uvolňují. Na jejich vzniku se rovněž podílí biochemické procesy v půdě a půdní mikroorganismy. Jílové minerály se skládají převážně z křemíku, hliníku, kyslíku a vodíku. V menším množství je zastoupen také vápník, hořčík, železo, draslík a zinek. Celkově zaujímají až 75 % z celkové hmotnosti půdy a bezpochyby patří mezi nejrozšířenější sekundární minerály horninového systému zemské kůry [2].

První definice „jílů“ byla podána již v roce 1546 Agricolou. Georgius Agricola byl významný německý učenec, jehož životním dílem je svazek 12 knih o hornictví a minerálech, *De re metallica libri XII*, jež shrnují soudobé znalosti i Agricolovy vlastní poznatky. Často je proto nazýván otcem mineralogie. Knihy byly od té doby samozřejmě mnohokrát revidovány, avšak hlavní rysy, které jsou důležité pro popis jílu a které vycházejí ze základních vlastností jílových minerálů (plasticita, sorpční vlastnosti), zůstávají zachovány dodnes [3]. Nomenklaturní komise AIPEA (Association Internationale Pour l'Étude des Argiles) a CMS (Clay Minerals Society) definuje jíl jako směsný přírodní materiál, primárně složený z jemně zrnitých materiálů, který je obecně plastický při přiměřeném obsahu vody a ztvdne po vysušení či vypálení [4].

Definice jílu podle velikosti částic je jiná v geologickém měřítku, kdy jsou definovány jílové částice o velikosti  $< 2 \mu\text{m}$ , v chemických vědách jsou to částice  $< 1 \mu\text{m}$  a v sedimentární geologii  $< 4 \mu\text{m}$ . Právě díky těmto malým rozměrům se jílové minerály vyznačují řadou unikátních vlastností jako je schopnost sorpce, iontovýměnná reakce, schopnost vázat vodu či reakce s organickými sloučeninami. V dnešní době řadíme jílové minerály k přírodním nanomateriálům, jejichž strukturu můžeme dle potřeby modifikovat a následně technologicky využít [5].

Využití jílových minerálů je rozsáhlé v celé řadě odvětví. V zemědělství jsou informace o jílových minerálech z hlediska vlastností půd velice důležité. Spolu s organickými zbytky,

oxidy a hydroxidy Fe, Al a Mn se zúčastňují všech důležitých pochodů v půdách. Působí zde rovněž jako katalyzátory umožňující reakce s organickými látkami. Jílové minerály slouží také jako zdroj draslíku, jenž je důležitý pro rostliny.

V papírenském průmyslu (plnivo do papírů), při výrobě sanitární keramiky, porcelánu, cementu a tmelů se nejčastěji používá kaolinit. Také ve stavebnictví se jílové minerály hojně využívají. Rovněž znalosti vlastností materiálů obsahujících jílový podíl jsou v tomto oboru velice důležité. Například u zakládání nových staveb nejrůznějšího typu jako jsou tunely, mosty či výškové budovy, jsou tyto znalosti nezbytnou zárukou bezpečnosti. Díky dobrým sorpčním vlastnostem se jílové minerály využívají jako selektivní sorbenty při adsorpci škodlivých a nežádoucích látek [5].

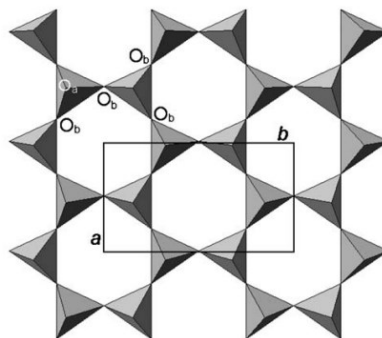
Významnou předností jílových minerálů je jejich nízká cena v porovnání s materiály, jež vykazují podobné vlastnosti. Díky své vrstevnaté struktuře, výše zmíněným unikátním vlastnostem a rovněž povrchovým vlastnostem (velikost povrchu dosahuje několika set m<sup>2</sup>/g) jsou jílové minerály perspektivní materiály s širokým spektrem využití v oblasti průmyslu, medicíny i farmacie.

### 2.1.1 Struktura a klasifikace vrstevnatých fylosilikátů

Jílové minerály patří do skupiny silikátů (křemičitanů). Z nich nejvýznamnější a nejčastěji se vyskytující jsou fylosilikáty. Slovo fylosilikát pochází z latinského slova *phillos*, což v překladu znamená list. Struktura je tedy tvořena „listy“, vrstvami. Proto je pro tyto jílové minerály typické jejich vrstevnaté uspořádání. Základní stavební jednotky fylosilikátů tvoří tetraedry a oktaedry, které jsou vzájemně spojeny pomocí atomů kyslíků a vytvářejí síť. Síť tetraedrů jsou spojeny se sítěmi oktaedrů sdílením aniontů a vytváří tak vrstvy.

#### Tetraedrická síť

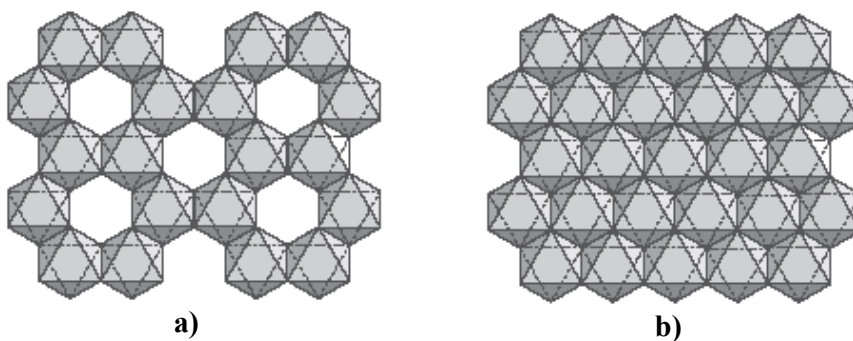
Základní stavební jednotkou struktury silikátů jsou tetraedry [SiO<sub>4</sub>]<sup>4-</sup> a kationty vyrovnávající záporný náboj tetraedrů (Al<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) [1]. Tyto tetraedry jsou vzájemně spojeny třemi vrcholy (bazální atomy kyslíku, označené O<sub>b</sub>) a čtvrtý atom kyslíku (vrcholový, apikální, označen O<sub>a</sub>) směřuje kolmo nad rovinu sítě, je tedy orientovaný na rovinu bazálních kyslíků (Obr. 1). Vazba sousedních tetraedrů se uskutečňuje pomocí společného kyslíkového atomu. Spojením hran nebo ploch tetraedrů vazba vzniknout nemůže. Centrálním kationtem tetraedrů je křemík Si<sup>4+</sup>, který může být substituován hliníkem Al<sup>3+</sup> za vzniku [AlO<sub>4</sub>]<sup>5-</sup> nebo železem Fe<sup>3+</sup> za vzniku [FeO<sub>4</sub>]<sup>5-</sup> [1].



**Obr. 1.** Tetraedrická síť,  $O_a$  – vrcholový kyslík,  $O_b$  – bazální atomy kyslíku. Parametry  $a$ ,  $b$  odpovídají základní ortogonální buňce  $T_4O_{10}$  [6].

### Oktaedrická síť

Oktaedry tvoří síť oktaedrů (osmistěňů), které spolu sdílí nejen vrcholy, ale také polovinu hran. V případě oktaedrů obklopuje centrální atom šest kyslíkových ( $O^{2-}$ ) nebo hydroxylových aniontů ( $OH^-$ ). Centrální atomy v oktaedrické síti mohou být obsazeny stejnými nebo různými kationy [ $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , atd.], nebo mohou zůstat neobsazené. Podle způsobu obsazení centrálních pozic jsou oktaedrické sítě **trioktaedrické**, kde jsou všechny oktaedrické pozice obsazeny kationty (Obr. 2b); **dioktaedrické**, kde jsou dvě ze tří oktaedrických pozic obsazeny kationty a třetí je vakantní (Obr. 2a); **monooktaedrické**, kde jsou dvě ze tří oktaedrických pozic vakantní a třetí je obsazena kationty [1].



**Obr. 2.** Oktaedrické sítě: a) dioktaedrická síť, b) trioktaedrická síť [6].

Výše uvedené rozdělení oktaedrické sítě vystihuje ideální případy, kdy trioktaedrická síť obsahuje tři kationty a dioktaedrická síť pouze dva. Ve skutečnosti se tyto hodnoty blíží číslu 2,5. Proto se obecně uvádí, že dioktaedrická síť obsahuje  $< 2,5$  kationtů a naopak trioktaedrická obsahuje  $> 2,5$  kationtů. Výskyt monooktaedrické sítě není příliš častý [1].

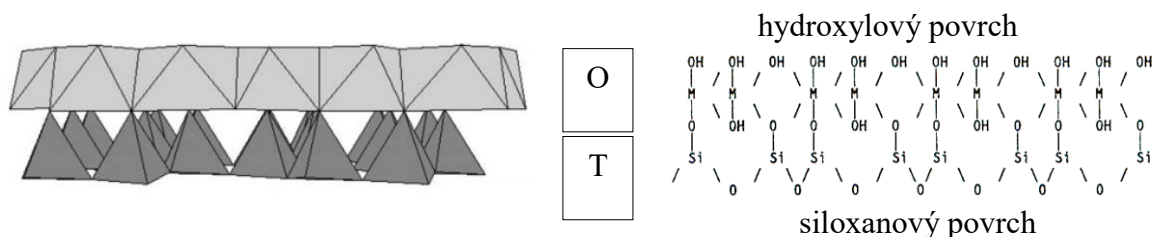
Podle způsobu obsazení centrálních pozic konkrétním kationtem jsou oktaedrické sítě označovány jako **homooktaedrické**, (kde jsou centrální atomy sousedních tří oktaedrů



obsazeny stejným způsobem), **mesooktaedrické**, (kde je jeden centrální atom ze tří sousedních oktaedrů obsazen jiným způsobem) a **heterooktaedrické**, (kde jsou všechny centrální atomy ze tří sousedních oktaedrů obsazeny jiným způsobem) [1, 7]. Oktaedry v sítích fylosilikátů jsou vždy deformované a právě způsob obsazení oktaedrických pozic a kvalita kationtů, jimiž jsou tyto pozice obsazeny, patří mezi hlavní faktory, které mohou ovlivnit velikost oktaedrů a tím i míru jejich deformace. Deformace každého oktaedru je potom produktem deformace celé oktaedrické sítě [1].

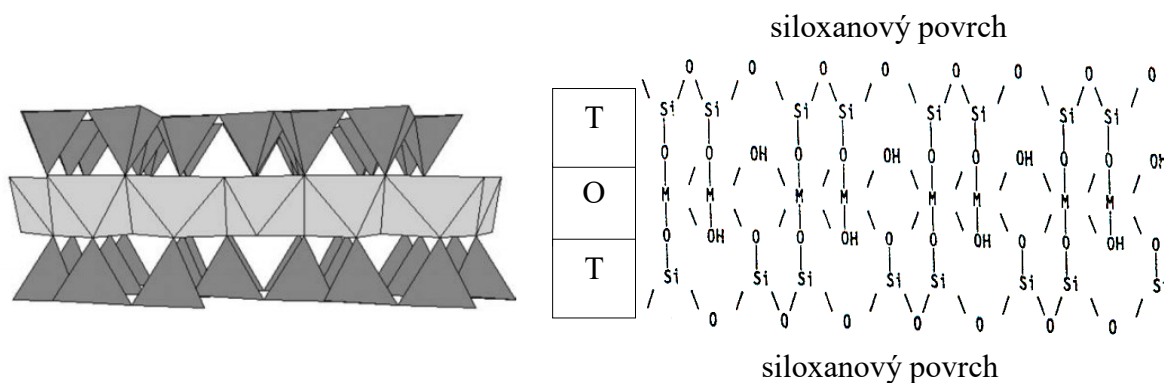
Ve strukturách fylosilikátů může docházet ke spojení dvou tetraedrických sítí nebo ke spojení tetraedrické a oktaedrické sítě. Spojení oktaedrické a tetraedrické sítě je realizováno přes společnou rovinu kyslíkových atomů. Vazby vzniklé sdílením kyslíkových atomů mají charakter polarizovaných kovalentních vazeb. Toto spojení se vyskytuje u všech fylosilikátů a díky tomuto spojení může docházet ke vzniku dvou typů strukturních jednotek, které označujeme jako vrstvy [1].

**Vrstva 1:1** – vzniká tehdy, má-li oktaedrická a tetraedrická síť jednu společnou rovinu atomů kyslíků. Nesdílené kyslíkové atomy tetraedrů vytváří rovinu tzv. bazálních kyslíků. Bazální atomy kyslíků u tetraedrů tvořených křemíkem tvoří tzv. siloxanový povrch a hydroxylové skupiny oktaedrů tvoří povrch hydroxylový (Obr. 3) [1].



**Obr. 3.** Schematické zobrazení spojení oktaedrické (O) a tetraedrické (T) sítě - vrstva 1:1 [5, 6].

**Vrstva 2:1** – je tvořena oktaedrickou sítí mezi dvěma přilehlými sítěmi tetraedrů, které jsou spojeny dvěma společnými rovinami kyslíkových atomů. Jedná se tedy o spojení jedné oktaedrické sítě a dvou tetraedrických sítí s opačnou polaritou. Nesdílené kyslíkové atomy tetraedrů tudíž vytvářejí dvě roviny bazálních kyslíků (Obr. 4) [1].



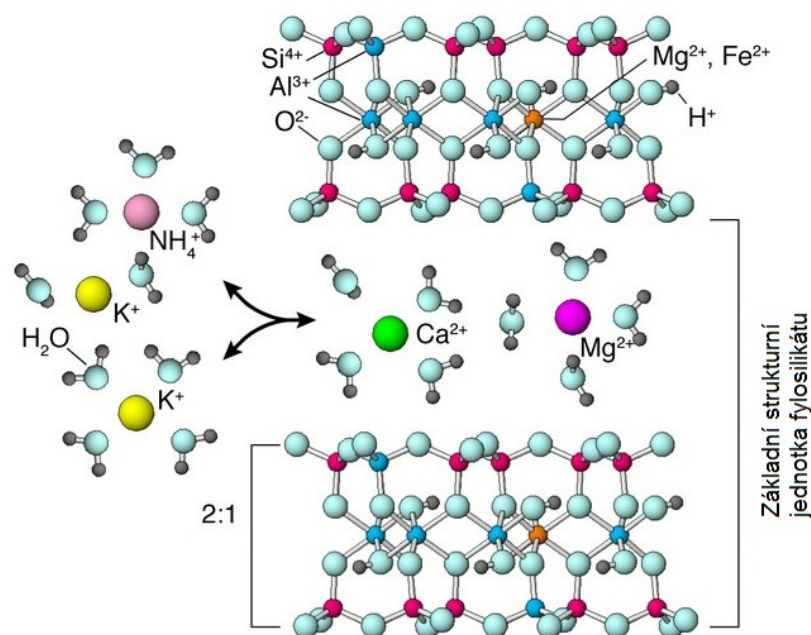
**Obr. 4.** Schematické zobrazení spojení oktaedrické (O) a dvou tetraedrických (T) sítí - vrstva 2:1 [5, 6].

Výše popsané způsoby spojení sítí vytvářejí předpoklady pro kladení sítí na sebe a to ve směru kolmém na tyto sítě. Sítě však mohou být jedna oproti druhé různě orientované či posunuté a jejich kladení na sebe potom není jednoznačné.

### Mezivrství

Prostor mezi vrstvami ve struktuře fylosilikátu vybudovaného z jednoho, nebo druhého typu vrstev je označen termínem mezivrství. Jedna vrstva plus mezivrství vytváří základní strukturní jednotku fylosilikátu (Obr. 5), která představuje jeho úplné složení [1].

V mezivrstevním prostoru se mohou vyskytovat jak jednomocné, tak i dvojmocné kationty. Nejčastěji zastoupené jsou ionty  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ,  $H_3O^+$  a  $H^+$ . Tyto kationty kompenzují negativní náboj vrstvy. Soubor iontů, atomů nebo jejich hydratovaných forem v prostorech mezivrství označujeme jako mezivrstevní materiál. Mezivrství také obsahuje proměnlivé množství vody. Tento prostor může být rovněž i prázdný, v tomto případě jsou jednotlivé vrstvy spojeny pouze pomocí Van der Waalových sil.



**Obr. 5.** Základní strukturní jednotka fylosilikátu s proměnlivým mezivrstevním materiálem [8].

### Klasifikace fylosilikátů

Vrstevnaté fylosilikáty (označené též jako fylosilikáty či planární silikáty) jsou klasifikovány na základě strukturních a chemických vlastností jejich strukturních jednotek. Strukturní charakteristikou je typ silikátové vrstvy (1:1 nebo 2:1). Chemickými charakteristikami jsou velikost náboje  $x$  na vrstvách a charakter materiálu v prostoru mezi vrstvami.

Rozdělení planárních fylosilikátů do skupin podle typu silikátových vrstev, náboje vrstvy a mezivrstevního materiálu je uvedeno v tabulce (Tab. 1). V mezivrstevním prostoru fylosilikátů mohou být přítomny jednomocné či dvojmocné kationty ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), vytvářející koordinační sféry, dále samostatné oktaedrické sítě, kde na místech aniontů vystupují skupiny  $OH^-$ , nebo hydratované vyměnitelné kationty. Existují však také fylosilikáty bez mezivrstevního materiálu, v nich jsou vrstvy vázány buď slabými Van der Waalsovými silami, nebo vodíkovými můstky.

Každá skupina je rozdělena podle počtu oktaedrických kationtů s hranicí 2,5, na dioktaedrickou a trioktaedrickou podskupinu. Záporný náboj vrstvy je vyjádřen na základní strukturní jednotku jako kladné číslo [5].

Do poslední skupiny jsou v Tab. 1 zařazeny planární fylosilikáty s pravidelně smíšenou strukturou. Termínem „smíšená struktura“ jsou označeny takové fylosilikáty, u nichž dochází k prorůstání základních strukturních jednotek různých typů. Například jemné prorůstání

strukturních jednotek dioktaedrické slídy a smektitu, kde obě jednotky sice obsahují vrstvy 2:1, ale výrazně se liší obsahem mezivrstev [1].

**Tab. 1.** Klasifikace vybraných vrstevnatých silikátů (upraveno dle Martin a kol. [9]).

Skupina	Typ vrstev	Mezivrstevní materiál, náboj ( $x$ )	Typ oktaedrické sítě	Minerály (příklad)
<b>Serpentin-kaolin</b>	1:1	Bez materiálu, nebo jen $H_2O$ $x \sim 0$	tri-	lizardit, amesit, cronstedtit, kellyit
			di-	kaolinit, dickit, halloysit
<b>Mastek-pyrofylit</b>	2:1	Bez materiálu, $x \sim 0$	tri-	mastek, kerolit
			di-	pyrofylit
<b>Slídy</b>	2:1	Nehydratované jednomocné kationty $x \sim 0,6 - 1,0$	tri-	annit, biotit, flogopit, trilitonit, aspidolit, efesit
			di-	muskovit, fengit, seladonit, paragonit, illit
<b>Křehké slídy</b>	2:1	Nehydratované dvojmocné kationty $x \sim 1,8 - 2,0$	tri-	clintonit, bityit, anandit
			di-	margarit, černikit
<b>Smektity</b>	2:1	Hydratované vyměnitelné kationty $x \sim 0,2 - 0,6$	tri-	saponit, hektorit, sauconit
			di-	montmorillonit, nontronit, beidellit
<b>Vermikulity</b>	2:1	Hydratované vyměnitelné kationty $x \sim 0,6 - 0,9$	tri-	trioktaedrický vermikulit
			di-	dioktaedrický vermikulit
<b>Chlority</b>	2:1	Hydroxidová síť $x$ variabilní	tri-, tri-	pennin, chamosit
			di-, di-	donbasit
			di-, tri-	cookeit, sudoit
<b>Pravidelně smíšené struktury</b>	2:1	Podle typu komponent, $x$ variabilní	tri-	corrensit, hydrobiotit
			di-	rectorit, tosudit

## 2.1.2 Vybrané charakteristiky vrstevnatých fylosilikátů

### 2.1.2.1 Náboj vrstvy

Celkový náboj struktury jílu se skládá z permanentního náboje (označovaného také jako strukturní) a variabilního náboje. Variabilní náboj je dán existencí poruch ve vazbách mezi ionty, které se vyskytují na hranách krystalů. Tento náboj představuje méně než 1 % z celkového náboje. Permanentní náboj vzniká substitucemi iontů nebo vakancemi v tetraedrických nebo oktaedrických sítích.

Negativní náboj vrstvy je charakteristickým znakem při klasifikaci 2:1 jílových minerálů. Může vznikat v případech, kdy křemičitý kation v tetraedrech je substituován kationtem hlinitým, nebo hlinitý kation v oktaedrech je nahrazen dvojmocným hořčíkem či železem. Tato substituce prvky s nižším mocenstvím vede k přebytku negativního náboje na vrstvě. Náboj vzniká také při neúplném obsazení kationtových pozic a existencí vakancí. Kvantitativní množství kationtů, které jílový minerál může vykazovat na negativně nabitém povrchu, je vyjádřen v mili-iont ekvivalentech (meq) na 100 g jílu. Elektroneutralita jednotlivých vrstev je zachována prostřednictvím iontů, které jsou umístěné v mezivrstevním prostoru [10].

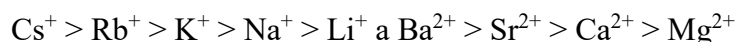
### 2.1.2.2 Kationtová výměnná kapacita

Kationtová výměnná kapacita (CEC) udává množství kladných iontů vázaných na negativní povrch jílového minerálu. Udává se v cmol(+)/kg (centimol kladného náboje na kilogram jílu) nebo meq/100 g (mili-equivalenty na 100 g jílu). Oba vztahy jsou si numericky rovny.

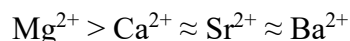
Výměnnou kapacitu vrstevnatých fylosilikátů ovlivňují dva původní zdroje:

1. Substituce kationtů v tetraedrech a oktaedrech produkuje náboj, který není ovlivněn pH prostředí. Stanovena hodnota CEC je neměnná.
2. Disociace aluminolových skupin Al-OH na hranách. Acidita těchto skupin je slabá a náboj závisí na pH systému.







Všeobecně platí, že jílové minerály preferují větší anorganické kationty před menšími. Přehled poloměrů nejběžnějších kationtů je uveden v Tab. 2. Např. pro smektity tato preference sleduje následující řadu [11]:



U jílových minerálů s vyšším náboje (např. vermikulit) tato preference není tak jednoznačná [11]:



**Tab. 2.** Velikost nejdůležitějších kationtů v půdě (kationt – černý, vodní obal – šrafovaný) [12].

	Poloměr iontů (nm)					
NEHYDRATOVANÝCH	0,098	0,133	0,143	0,078	0,205	0,035
HYDRATOVANÝCH	0,38	0,26	0,27	0,32	0,28	0,135
	<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>H<sup>+</sup></b>
						

Většina metod stanovení CEC jílu ve vodné suspenzi je založena na výměně iontů v mezivrstvi při neutrálním pH. Kationtová výměna je reversibilní děj. Je tedy možné kationty zpětně vyměnit a tak zjistit jejich obsah [5]. V následující tabulce (Tab. 3) jsou uvedeny hodnoty CEC nejznámějších jílových minerálů.

**Tab. 3.** CEC vybraných jílových minerálů [13].

Minerál	CEC (meq/100 g)
Kaolinit	3 – 15
Illit	10 - 40
Montmorillonit	70 – 120
Vermikulit	130 – 210

Uvedené hodnoty CEC vybraných jílových minerálů (Tab. 3) vykazují relativně široký interval hodnot. To je způsobeno tím, že hodnota CEC je ovlivněna řadou faktorů, jako je povaha vyměnitelných kationtů, velikost částic (mletí může ovlivnit CEC), teplota a fázové podmínky (zředěný nebo koncentrovaný vodný roztok, organická rozpouštědla, reakce v pevné fázi). Výsledkem je, že přesné stanovení CEC je velmi obtížné. Co nejpřesnější stanovení vyžaduje úplnou náhradu všech vyměnitelných kationtů za nové kationty, které ovšem nebyly přítomné v původním vzorku jílového minerálu [11].

### 2.1.3 Modifikace vrstevnatých fylosilikátů

Modifikace vrstevnatých silikátů (mechanické a chemické) významně ovlivňují fyzikální i chemické vlastnosti povrchů fylosilikátů. Mezi hlavní patří mletí, aktivace kyselinou a interkalace. Při přípravě organo-anorganických hybridních materiálů je stěžejním krokem právě interkalace organické látky, rovněž mechanická úprava povrchu použitého materiálu může mít zásadní vliv na požadované vlastnosti. Vzhledem k tomu, jsou právě tyto metody modifikace nedílnou součástí přípravy vzorků této disertační práce.

#### 2.1.3.1 Mletí

Mletí řadíme mezi základní mechanické úpravy materiálu, kdy je požadována u vrstevnatého minerálu aktivace specifického povrchu a jeho zvětšení. Je to proces, při kterém se působením vnějších sil překonávají vnitřní mezimolekulární síly soudružnosti a dochází k rozrušení zrn. Při jejich rozpadu vzniká soubor menších zrn a současně vzrůstá celkový povrch. Mletím vrstevnatých silikátů dochází k porušení pravidelnosti kladu vrstev ve směru kolmém na jejich vrstevnatost. Získáváme homogenní materiál s redukovanou velikostí částic. Prodloužení doby mletí vede k amorfizaci vrstevnaté struktury a vzniku tvrdých aglomerátů. Malé částice se dlouhodobým mletím nabalují na sebe a vytvářejí shluky, které mají v konečném stádiu menší specifický povrch než samotné volné částice [14-19].

Rozdílné technologické postupy a různé speciální požadavky výrobních provozů kladou vysoké nároky na používané mlýny. Proto se používá velký počet rozdílných typů a konstrukcí mlýnů. V dnešní době jsou využívány kulové, vibrační či tryskové mlýny, kde může mletí probíhat buď za sucha, nebo ve vodě. Tyto mlýny byly rovněž použity pro přípravu vzorků, jež jsou předmětem této disertační práce.

*Kulový (planetový) mlýn* - V planetovém mlýnu je vzorek vkládán do mlecí misky spolu s mlecími kuličkami (většinou achátové). Mlecí misky jsou upevněny na centrálním disku. Při spuštění mlýnu se misky otáčí kolem své osy a zároveň rotují v protisměru kolem osy centrálního disku. Výrazným kinetickým působením kuliček a jejich třením o stěnu misky je vzorek efektivně rozemlet [16].

*Vibrační mlýn* – Vibrační mlýn mele na principu nárazu a tření. Mlecí nástroje se upevňují rychloupínací pákou pevně na oscilační talíř. Talíř s mlecími nástroji je vystaven kruhovým horizontálním vibracím. Odstředivá síla působící na mlecí kroužky, které v mlecím šálku vytváří vysoký účinek tlaku, nárazu a tření, které působí na vzorek a produkují analytickou jemnost v průběhu 1-3 minut [18].

*Tryskové mlýny* – Tyto mlýny pracují na principu autogenního mletí. Od ostatních mlýnů se liší tím, že nemají žádné pohyblivé součásti. Vlastní proces mletí probíhá v mlecí komůrce, kam je rozemílaný materiál dopravován velmi rychle proudícím médiem – stlačeným vzduchem. Jednotlivá zrna na sebe narážejí rychlostí 100 až 1000 m/s, otírají se navzájem, i o stěny mlecí komůrky a tím dochází k zjemňování. Mletý materiál, přiváděný podavačem, je účinkem nosného média, proudícího tryskami, uváděn do vířivého pohybu. Účinkem odstředivých sil se oddělují hrubší podíly, které se hromadí v zásobníku, zatímco jemnější částice jsou unášeny k odlučovači s tkaninovým filtrem [20].

Mechanické změny ve struktuře mletého materiálu jsou proměnné a závisí na použité metodě mletí. Obecně se předpokládá, že krátkodobé mletí jílového minerálu vede ke zmenšení velikostí částic a ke zvětšení specifického povrchu. Ovšem delší doba mletí již vede ke zborcení struktury a ztrátě vrstevnatého charakteru. Tím dochází k amorfizaci se spojením částic do větších aglomerátů a poklesu specifického povrchu [14, 16].

Maqueda a kol. [17] sledovali vliv doby mletí a loužení kyselinou o různé koncentraci na strukturní vlastnosti výchozího vermikulitu. K mletí byl použit vibrační mlýn a k chemickému loužení byly použity 3 různé koncentrace HCl. Bylo zjištěno, že mletí vede ke ztrátě periodicity na sebe uložených vrstev ve směru kolmém na planární rovinu a ke snížení velikosti krystalitů. Na RTG záznamech byly pozorovány změny intenzit a profilů bazálních difrakcí po krátkodobém mletí, avšak po mletí trvajícím 15 min všechny píky zmizely, což svědčí o amorfizaci materiálu. Chemická úprava výchozího vermikulitu vedla ke snížení intenzity bazálních reflexí, přičemž bylo snížení větší s rostoucí koncentrací použité kyseliny. Autoři především sledovali porézní vlastnosti připravených vermikulitů a bylo zjištěno, že s mletím dochází ke zdvojnásobení hodnoty specifického povrchu, avšak objem pórů byl nula. Úprava kyselinou vedla ke vzniku porézní struktury s nárůstem specifického povrchu více než 20-ti násobně. S rostoucí koncentrací použité kyseliny rostl objem pórů a spolu s ním i specifický povrch.

Jedním ze způsobů mechanické úpravy fylosilikátů je mletí v tryskovém mlýnu. Tryskové mlýny spadají do kategorie jemného mletí, při kterém dochází kromě zmenšení částic také k fyzikálním a chemickým změnám na povrchu. K těmto změnám dochází vlivem velmi velké energie, která je vynaložena na samotný proces mletí. Obecně se uvádí, že pouze 2 % dodané energie je použito na samotné mletí. Nevýhodou tryskového mletí je tedy jeho velmi vysoká energetická náročnost [16].

Palaniandy a kol. [15] zkoumali podmínky tryskového mletí na vlastnosti výsledného produktu. Jako výchozí materiál použili mastek a zjistili, že kromě zmenšení velikostí částic



došlo rovněž k mechanochemickým změnám na povrchu mastku. Podávací rychlost, rotační rychlost a mlecí tlak významně ovlivňují velikost částic. K získání částic  $< 10 \mu\text{m}$  jsou optimální podmínky tryskového mlýnu s parametry podávací rychlost 12 kg/h, rotace 7000 ot./min a tlak 6 bar.

#### **2.1.3.2 Modifikace ultrazvukem**

Ultrazvuk je alternativní metoda umožňující zmenšení částic s použitím vyšší mechanické energie. Při zavedení tyčového ultrazvuku do roztoku, dochází v důsledku kavitačních dějů k rozkmitání jednotlivých částic v axiálním směru podle frekvence vlnění a následně k oddělování jednotlivých vrstev. Navíc dochází k plastickým deformacím a tím k rozduřování částic. Tato metoda upřednostňuje štípání materiálu po jednotlivých vrstvách a nedochází prakticky k žádnému drcení, jako u klasického mletí [21]. Při srovnání částic vermikulitu získaných mletím a po působení ultrazvuku bylo zjištěno, že v ultrazvuku připravené částice si zachovaly morfologii částic původního vermikulitu [22]. Přípravou a charakterizací částic vermikulitu o mikronové velikosti se zabývá řada prací [23-26].

#### **2.1.3.3 Exfoliace a delaminace**

Během procesu zmenšování částic, dochází k jejich exfoliaci nebo delaminaci.

*Exfoliace* – vyjadřuje určitý stupeň separace vrstev původního vrstevnatého silikátu, které mohou být volné a na sobě nezávisle orientovány. Exfoliací je narušena orientace mezi silikátovými vrstvami a vazebné síly jsou přerušeny [27-29]. Separované silikátové vrstvy jsou tedy volné a na sobě nezávisle orientovány v disperzi, rozpouštědle nebo polymerní matici.

*Delaminace* – je proces, při kterém dochází k rozpadu agregátů vrstev na jednotlivé vrstvy silikátu. Uložení vrstev však zůstává zachováno. Výsledkem je zvýšení specifického povrchu fylosilikátu [29-31].

#### **2.1.3.4 Aktivace kyselinou**

Působení kyselin na vrstevnaté silikáty při dané teplotě je označováno jako aktivace kyselinami nebo selektivní loužení.

Při aktivaci kyselinou nejprve dochází k odstranění vyměnitelných kationtů a jejich nahrazení  $\text{H}^+$  protony kyseliny v mezivrstvích. Dále dochází k loužení tetraedrických a oktaedrických kationtů  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  při zachování tetraedricky koordinovaných kationtů  $\text{Si}^{4+}$  v tetraedrických sítích. Hydratované protony tedy narušují vrstvy jak na povrchu, tak i v mezivrstvích [5].

Během selektivního loužení dochází ke zvětšení specifického povrchu po rozpadu částic na menší, při odstranění nečistot a kovových výměnných kationtů, či při rozpouštění vnější vrstvy. Aktivace je hodnocena podle destrukce původního smektitu, odstranění oktaedrických kationtů a vzniku amorfni Si-fáze. Selektivní loužení s použitím koncentrovaných kyselin patří k důležitým postupům přípravy porézních materiálů. Během takového loužení jsou oktaedrické kationty uvolněny mimo strukturu a tetraedrická síť vytváří amorfni silikagel. Aktivace zředěnějšími kyselinami se provádí za účelem jejich využití jako katalyzátorů a sorbentů, neboť nastává výrazné zvětšení specifického povrchu materiálů [32].

Vliv loužení kyselinou na výslednou strukturu vermikulitu studoval Temuujin a kol. [33]. Ve studii sledovali jak vliv koncentrace použité kyseliny, tak i dobu loužení. Bylo zjištěno, že s koncentrací použité kyseliny a s časem loužení narůstá specifický povrch výsledného vermikulitu a rovněž objem pórů. Ovšem jak koncentrace, tak i čas loužení má optimální hodnotu. Po překročení této hodnoty již dochází ke snížení specifického povrchu. Autoři předpokládají, že pokud vermikulit obsahuje v tetragonální síti kationty  $\text{Si}^{4+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , pak  $\text{Fe}^{3+}$  kationty jsou louženy pomaleji než  $\text{Al}^{3+}$ , což může stabilizovat tetraedrickou síť a výsledná struktura tak bude mikroporézní s velkým specifickým povrchem.

Vliv přítomnosti železa ve vrstvách vermikulitu na výsledný produkt loužení vermikulitu potvrdili Maqueda a kol. [17] Loužení pomletého vermikulitu v kyselině chlorovodíkové mělo za následek uvolnění téměř všech kationtů  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Al}^{3+}$  ze struktury (oktaedrů), přičemž byly zachovány tetraedrické a oktaedrické kationty  $\text{Si}^{4+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Výsledný vermikulit vykazoval velmi velký specifický povrch a amorfni charakter.

V další studii se Maqueda a kol. zabývali porovnáním specifického povrchu mletého a nemletého vermikulitu po působení kyseliny. Dospěli k závěru, že nemletý vermikulit aktivovaný 1M kyselinou chlorovodíkovou měl specifický povrch kolem  $500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , zatímco 4 min mletý kyselinou aktivovaný vermikulit měl podstatně větší specifický povrch s hodnotou  $700 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  [14].

#### 2.1.3.5 Roubování

Během procesu roubování dochází ke vzniku kovalentních vazeb mezi reaktivními skupinami vrstev (hydroxylové skupiny) a funkčními organickými aloxy skupinami. Hydrolýzou aloxy skupin vznikají skupiny silanolové, které reagují s povrchovými skupinami jílového minerálu za vzniku ionokovalentní vazby  $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$  nebo  $\text{Al} - \text{O} - \text{Si}$ . Tyto organicko-anorganické hybridní sloučeniny vykazují mechanickou stabilitu anorganické struktury se

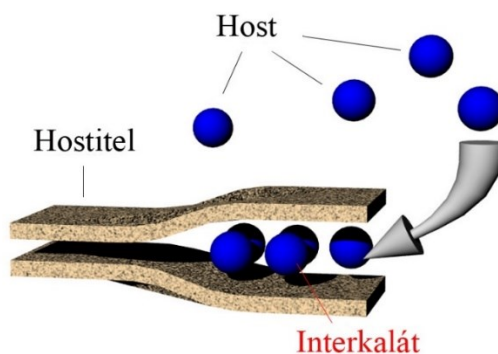
specifickou reaktivitou organofunkčních skupin. Roubování patří k důležitým procesům hydrofobizace povrchu částic jílových minerálů [5, 34-37].

### 2.1.3.6 Interkalace

Interkalace (Obr. 6) je proces vstupu molekul hosta, např. do mezivrsteví vrstevnaté struktury jílového minerálu (hostitele). Vzniká interkalovaná struktura, v níž se uplatňují pevné kovalentní vazby ve vrstvách hostitele a slabé vazebné síly mezi hostitelskou maticí a hostem [38-40].

Interkalace do hostitelské struktury vermikulitů může probíhat buď na bázi iontové výměny, kdy jsou organické molekuly interkalovány jako kationty, nebo jsou interkalovány neutrální organické molekuly a původní kationty v mezivrsteví částečně, nebo zcela zůstávají. V přírodních jílových minerálech je mezivrstevní prostor vyplněn kovovými kationty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a proměnlivým obsahem vody. V jejich interkalovaných formách je tento prostor vyplněn komplexními molekulami hosta – interkalantu (interkalární reakce je iontově výměnná), anebo původními mezivrstevními kationty s polárními neutrálními molekulami hosta (interkalační reakce je založena na ion-dipólové interakci).

Vývoj interkalované struktury je závislý na řadě faktorů. Důležitá je především koncentrace organických molekul (hostů), jejich velikost, schopnost interakce mezi hostitelskou strukturou a molekulami hosta. Při interkalaci postupem iontové výměny je důležitá míra iontové výměnné kapacity a rozdělení nábojové hustoty na vrstvě 2:1.



**Obr. 6.** Obecné schéma procesu interkalace [41].

Proces interkalace je obvykle spojován s výrazným bobtnáním struktury jílového minerálu ve směru kolmém na vrstvy, a to z toho důvodu, že interkalované organické molekuly jsou rozměrově obvykle větší než stávající mezivrstevní materiál přírodního jílu [1].

Interkalační proces u jílových minerálů může být realizován třemi způsoby:

1. Reakcí mezi jílovým minerálem (pevná fáze) a roztokem v němž je obsažena organická látka.
2. Reakcí mezi jílovým minerálem a parami organické látky.
3. Reakcí mezi jílovým minerálem a organickou látkou, která je také v pevném stavu. Reakce probíhá při mechanických postupech (mletí) k nebo působením vyšší teploty.

Reakce jílového minerálu s roztokem organické látky patří k nejčastěji využívaným interkalačním reakcím. Mezivrstevní kationty jílového minerálu jsou skrze ionto-výměnnou reakci vyměněny za organické molekuly z roztoku. Interkalací chlorhexidinu (CA) do montmorillonitu se zabýval Yang a kol. [42]. Montmorillonit byl rozpuštěn ve vodě a chlorhexidin v etanolu. Oba roztoky byly poté smíchány, odstředěny a vysušeny za vzniku organomontmorillonitu. Autoři připravili vzorky s různým obsahem CA, jehož skutečné navázané množství stanovovali pomocí termogravimetrické analýzy. Zjistili, že po interkalaci chlorhexidinem dochází ke změně hydrofilního povrchu montmorillonitu na povrch hydrofobní. Rovněž se ukázalo, že mezivrstevní kationty v přírodním montmorillonitu mírně ovlivňují strukturu výsledných interkalátů. Antibakteriální testy potvrdily závislost interkalovaného množství CA na výsledné antibakteriální účinnosti.

Reakce mezi jílovým minerálem a parami organické látky jsou méně využívanou metodou interkalace. V 70. letech byla provedena řada studií zabývajících se interkalací par benzenu do mezivrsteví Cu-montmorillonitu a Cu-hektoritu. Příprava probíhala umístěním vysušeného jílového minerálu a kádinky s benzenem do exsikátoru. Benzenové páry reagovaly s Cu-montmorillonitem a Cu-hektorem a částečně nahradily hydratovanou vodu v mezivrsteví. Vznikly žluté komplexy, kde  $\pi$  elektrony benzenového kruhu interagovaly s Cu ionty. Úplné odstranění mezivrstevní vody vedlo ke vzniku červeného komplexu benzen-jílový minerál. Tohoto bylo dosaženo transférem jednoho elektronu z benzenu do mezivrstevního kationtu, čímž došlo ke ztrátě aromaticity benzenu. Tato metoda se používá pro přípravu vzorků, které nejsou stabilní v homogenním roztoku, ale jsou stabilní v mezivrstevním prostoru [43, 44].

Reakce mezi jílovým minerálem a organickou látkou v pevném stavu má velkou výhodu v případě přípravy organojílového minerálu, kdy organický host se nenachází nebo je obtížně dostupný v kapalně fázi. Např. Ogawa a kol. provedli interkalaci pevného 2,2'-bipyridinu do mezivrsteví montmorillonitu. Vzniklý 2,2'-bipyridin-montmorillonit byl připraven jednoduchým mechanickým třením práškového montmorillonitu s práškovým 2,2'-bipyridinem

v achátové misce. Strukturní vlastnosti takto připraveného organomontmorillonitu byly srovnány se shodným vzorkem připraveným klasickou ionto-výměnnou reakcí z roztoku. Dle uvedené studie se strukturní vlastnosti dvou stejných vzorků, které byly připraveny dvěma odlišnými metodami, nelišily, a proto je metoda interkalace pevná fáze-pevná fáze využitelná pro přípravu řady organojílových komplexů [45].

### 2.1.3.7 Monoionní formy fylosilikátů

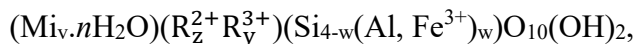
U přírodních forem smektitů a vermikulitů bývá mezivrstvi obsazeno jednomocnými ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) a dvojmocnými ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) kationty, přičemž jako dominující jsou obvykle kationty  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Na}^+$ . Na složení kationtů v mezivrstvi závisí řada chemických, mechanických a tepelných vlastností daného jílového minerálu [48-51]. Například převaha  $\text{Na}^+$  kationtu ovlivňuje reologické vlastnosti (viskozitu, tixotropii, atd.) [52]. Pro řadu praktických i laboratorních aplikací je proto výhodné, aby byly mezivrstevní pozice obsazeny jen jedním typem kationtu. Toho lze dosáhnout vícenásobným sycením jílového minerálu příslušným kationtem z vodného roztoku jeho chloridu, dusičnanu nebo octanu, přičemž vzniká požadovaná monoionní forma jílového minerálu [53]. Míra iontové výměny závisí na koncentraci kationtu ve vodném roztoku. Tato výměnná reakce neprobíhá často kvantitativně, protože různé kationty nejsou stejně vyměnitelné (nemají stejnou výměnnou sílu) a závisí na výrazné převaze vyměněného kationtu v mezivrstvi [1].

Přestože se iontovýměnnými reakcemi vermikulitů a jiných jílových minerálů zabývá řada výzkumných týmů [13, 48-52], žádná z výsledných publikací však nesrovnává vlastnosti různých monoionních forem jílových minerálů, natož pak antibakteriální vlastnosti z nich připravených organovermikulitů.

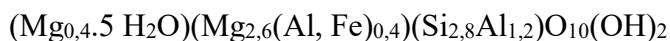
## 2.2 Vermikulit

Vermikulit patří do skupiny fylosilikátů neboli vrstevnatých silikátů. Vzniká především přeměnou minerálů skupiny slídy (biotitu), méně často pak přeměnou amfibolu a chloritu. V přírodě se vermikulit vyskytuje ve smíšených (interstratifikovaných) strukturách jako je biotit-vermikulit, flogopit-vermikulit či vermikulit-chlorit. Vermikulizace totiž není konečným stupněm přeměny slída-vermikulit-smektit [54]. Výskyt vermikulitu je celosvětový. Velká ložiska se nacházejí především v oblasti jižní Ameriky (Brazílie), USA, Číny anebo jižní Afriky (oblast Palabora, Jihoafrická republika). Vyskytuje se ve formě šupinkových agregátů hnědo-bronzové barvy s výrazným perleťovým leskem.

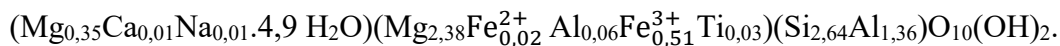
Krystalová struktura vermikulitu je tvořena 2:1 vrstvami, které jsou od sebe vzdáleny přibližně 14 Å (1,4 nm). Přesná vzdálenost je však závislá na mezivrstevním materiálu. Mg-vermikulity patří k trioktaedrickým fylosilikátům s dominantním kationtem  $\text{Mg}^{2+}$  v oktaedrech. Chemické složení vermikulitů lze vyjádřit obecným krystalochemickým vzorcem (na vzorcovou jednotkovou buňku):



kde  $\text{Mi}$  jsou mezivrstevní vyměnitelné kationty, jimiž je kompenzován náboj  $x$  vrstvy 2:1 ( $x = 6 + w - 3y - 2z$ ), který se podle klasifikace u vermikulitů pohybuje v intervalu od 0,6 do 0,9 [9]. Jako oktaedrické kationty dvojmocné ( $\text{R}^{2+}$ ) vystupují nejčastěji ionty  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Ni}^{2+}$  a trojmocné ( $\text{R}^{3+}$ ) pak  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Na základě chemické analýzy bylo stanoveno chemické složení přírodních (pravých) vermikulitů, které bylo vyjádřeno následujícím idealizovaným vzorcem [58]:

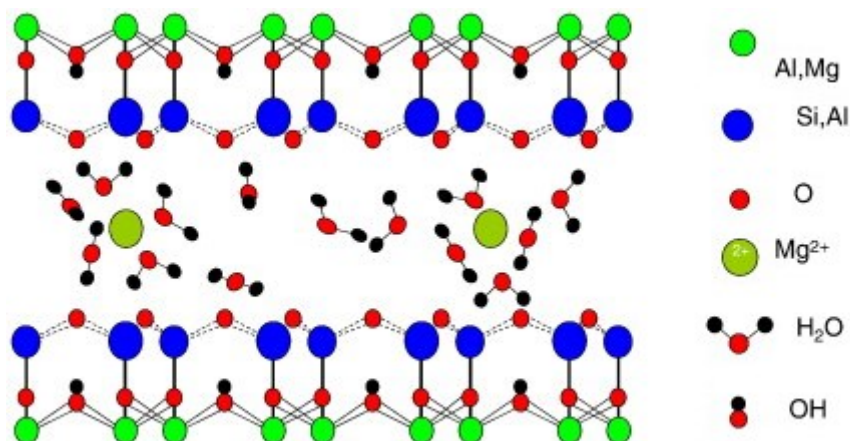


Krystalochemickou charakterizaci struktury Mg-vermikulitu z českého ložiska v Letovicích publikoval Weiss [55]. Z následujícího krystalochemického vzorce vidíme rozdíl mezi skutečným a idealizovaným složením přírodního vermikulitu.



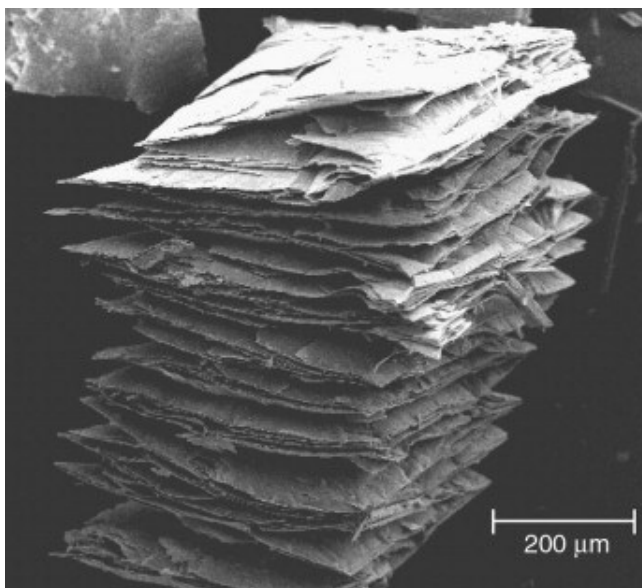
V přírodních vermikulitech převládá z vyměnitelných mezivrstevních kationtů  $\text{Mg}^{2+}$ , který se do struktury dostává při jeho vzniku, nejčastěji zvětráváním biotitu. Původní mezivrstevní kationt může být snadno vyměněn za jiný (např. za  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ), čímž vzniká monoionní forma. Podle dominujícího mezivrstevního kationtu jsou pak vermikulity označovány předponou. Například vermikulit s dominujícím  $\text{Mg}^{2+}$  kationtem je označen jako Mg-vermikulit a jeho modifikovaná forma, kde byly  $\text{Mg}^{2+}$  vyměněny za  $\text{Na}^+$  se označuje jako Na-vermikulit [1].

Na následujícím obrázku (Obr. 7) je znázorněno schéma struktury vermikulitu s 2:1 silikátovými vrstvami a hydratovanými  $\text{Mg}^{2+}$  kationty v mezivrstevním prostoru.



**Obr. 7.** Schematické zobrazení struktury vermikulitu [56].

Důležitou vlastností struktury vermikulitů je schopnost přijímat a uvolňovat molekuly vody (rehydratace a dehydratace). Tato důležitá vlastnost závisí na vnějších podmínkách a souvisí se změnami ve struktuře mezivrstev. Dehydratace Mg-vermikulitu probíhá postupně [1]. V prvním stupni dehydratace, v teplotním intervalu 20 – 130 °C, dochází k přeskupení molekul vody okolo kationtů Mg<sup>2+</sup> a k přeměně dvou vrstev molekul vody na jednu vrstvu molekul vody obklopující mezivrstevní kationty. Energeticky nejslaběji jsou vázané molekuly vody, které nejsou v přímém kontaktu s mezivrstevními kationty. Druhý stupeň dehydratace při 140 – 240 °C odpovídá ztrátě volněji koordinovaných molekul vody. Při dehydrataci vermikulitu v teplotním rozsahu 500 - 700 °C nastává kontrakce struktury minerálu ve směru kolmém na klad vrstev. Tento vermikulit již není schopen rehydratovat. Při vyšších teplotách 700 – 1000 °C nastává dehydroxylace a fázová přeměna dehydratovaného vermikulitu. Při takto vysokých teplotách vermikulit silně expanduje a zvyšuje tak svůj objem až dvacetinásobně (Obr. 8). Navzdory nárůstu objemu dochází k výraznému snížení hmotnosti a to i desetinásobně [5, 7].



**Obr. 8.** SEM snímek expandovaného vermikulitu prudce zahřátého na 1000 °C během 1 min [57].

Expanze je dobře viditelná při rychlém žhání vermikulitu na vysokou teplotu, kdy dochází k prudkému úniku mezivrstevní vody podél ploch vrstevnatosti. To způsobuje viditelnou exfoliaci šupinek a částice expandují, často do formy červíkovitých agregátů [1]. Takto expandovaný vermikulit je velmi lehký, což plyne z mnohonásobného poklesu hmotnosti, dobře tepelně a zvukově izoluje, je chemicky inertní, nedráždivý, bez zápachu, nezvětrává a je žáruvzdorný [58]. Díky těmto vlastnostem našel vermikulit široké uplatnění nejen ve stavebnictví.

### 2.3 Chlorhexidin

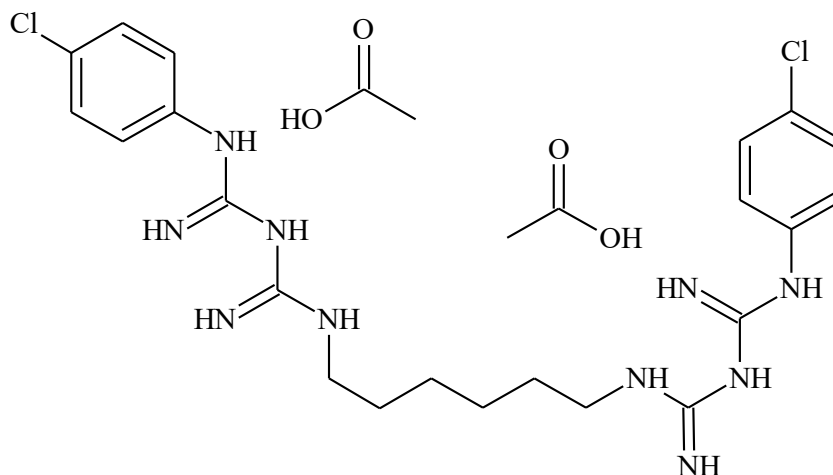
Chlorhexidin je antimikrobiální činidlo s širokým spektrem účinnosti. Antibakteriálně působí proti gram-pozitivním bakteriím (např. *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*), gram-negativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*), kvasinkám, plísním a některým virům. V závislosti na koncentraci a druhu bakteriálního kmene, jsou účinky chlorhexidinu bakteriostatické (zabraňuje množení bakterií) až baktericidní (způsobí úmrtí organismu).

Z chemického hlediska je chlorhexidin charakterizován jako silná zásada s kationaktivními vlastnostmi. Jedná se o substituovaný biguanidin s chemickým názvem *N,N*-bis(4-chlorfenyl)-3,12-diimin-2,4,11,13-tetraazatetradekandiimidamid.

Chlorhexidin je dostupný jak ve formě volné báze, tak ve formě stabilních solí, které tvoří s kyselinami. Mezi soli, které tvoří chlorhexidin s kyselinami patří např. chlorhexidin

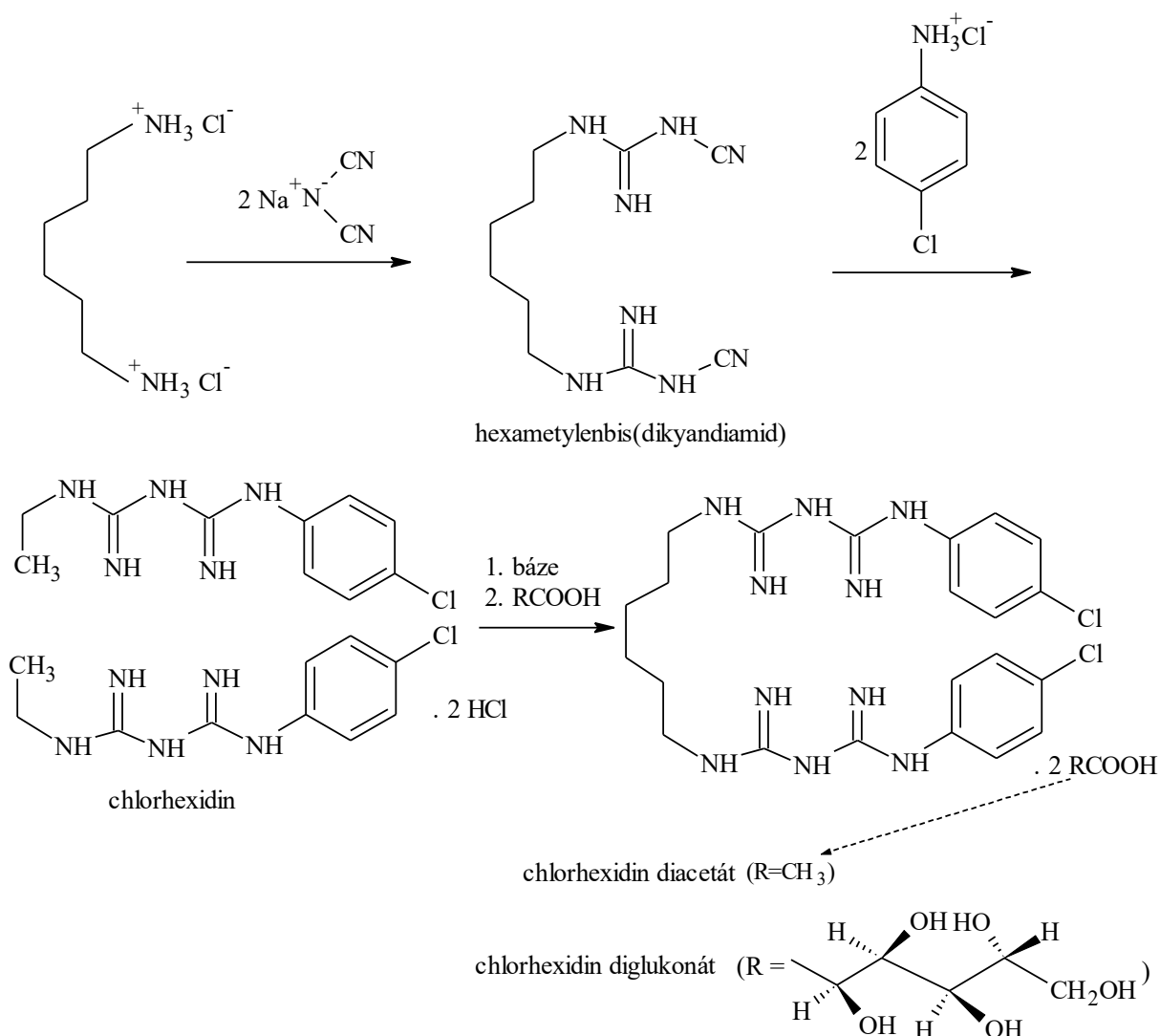


diacetát (CA) Obr. 9, chlorhexidin diglukonát, chlorhexidin dihydrochlorid, chlorhexidin glukonát, které jsou v roztoku bezbarvé, bez zápachu a mají extrémně hořkou chuť [59]. Chlorhexidin v pevném stavu má bílý až nažloutlý vzhled.



**Obr. 9.** Strukturní vzorec chlorhexidinu diacetátu [60].

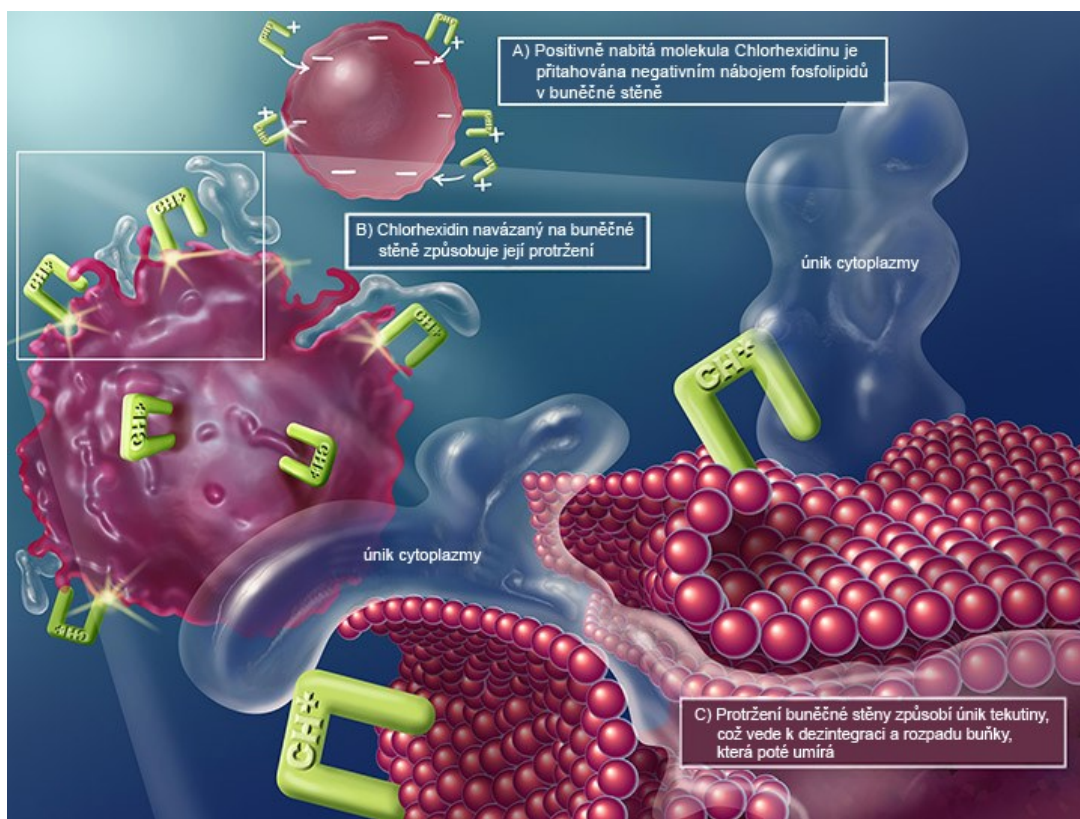
Jeden ze způsobů přípravy chlorhexidinu je znázorněn v následujícím schématu syntézy (Obr. 10) vycházející z 1,6-hexandiaminu(hexametylendiaminu). Ten reakcí s dikyanamidem sodným poskytne hexametylenbis(dikyanamid). V posledním stupni syntézy se adují dvě molekuly *p*-chloranilinu na nitrilové skupiny bis(dikyanamidu) [61].



**Obr. 10.** Schéma syntézy chlorhexidinu, chlorhexidin diacetátu [61].

Antibakteriální účinnost chlorhexidinu je založena na jeho schopnosti navázat se na povrch bakteriální buňky. Předpokládá se, že aktivním centrem molekuly chlorhexidinu je bis(biguanidové) seskupení, jenž zapříčiňuje rozrušení membrány mikroorganismů [62]. Pozitivně nabitá molekula chlorhexidinu se pevně váže na negativně nabitá místa stěny bakteriální buňky. Takto dochází k destabilizaci buněčné stěny a následné narušení osmóz. Navázání chlorhexidinu na buněčnou stěnu bakterie je většinou velmi rychlý proces a dochází k němu již během 20 sekund [59]. Při nízkých koncentracích dochází během navázání chlorhexidinu v membráně buňky k dezorientaci lipoproteinové struktury. To má za následek zvýšení permeability membrány a únik důležitého nitrobuněčného obsahu. Ve vyšších koncentracích se chlorhexidin váže na fosfolipidy vnitřní strany membrány. Dochází k zvýšení

propustnosti a úniku nízkomolekulárních látek, což vede ke vzniku sraženiny cytoplazmy a následnému úmrtí buňky (Obr. 11) [62].



**Obr. 11.** Schéma působení chlorhexidinu na povrchu buňky [59].

Mechanismus účinku chlorhexidinu proti plísním je velmi podobný tomu proti bakteriím. Buňka plísně rychle přitáhne molekulu chlorhexidinu, který způsobí narušení integrity buněčné stěny, což vyústí k úniku cytoplazmy a následně ke smrti buňky [59].

Chlorhexidin má rovněž schopnost zabránit nebo alespoň zpomalit růst mikroorganismů a vytvoření biofilmu. Biofilmy jsou komplexní agregace mikroorganismů, které rostou na pevném substrátu. Mohou se vyskytovat jak na organických, tak na anorganických površích. Biofilmy je možné charakterizovat strukturální heterogenitou, genetickou diverzitou, komplexní vzájemnou interakcí a extracelulární maticí z polymerních látek. Tato matrice chrání buňky uvnitř a zvyšuje jejich odolnost proti antimikrobiálním činidlům. Mnoho antimikrobiálních činidel má velké problémy eliminovat organismy ve formě biofilmu. Chlorhexidin však vykazuje schopnost snížit adhezi mikroorganismů k povrchu a tím pádem zabránit následnému růstu a tvorbě biofilmů [59].

Chlorhexidin je významné antiseptikum, které bylo poprvé syntetizováno roku 1940 a o patnáct let později bylo zkomercializováno a zavedeno do praxe. Největší uplatnění nacházejí sloučeniny chlorhexidinu v oblasti zubního lékařství a ústní hygieny. Hrají důležitou roli

při léčbě onemocnění dásní (gingivitida) a ústní sliznice. Jsou součástí ústních vod a přípravků zamezujících šíření zubního plaku. V roce 1962 byl totiž objeven jeho významný antiplakový efekt a do dnešního dne je chlorhexidin považován za nejúčinnější látku v boji proti zubnímu plaku. Chlorhexidin se dokáže vázat na epiteliální buňky ústní sliznice a na povrchy jako jsou zuby, povlaky či sliny. Bylo prokázáno, že po výplachu úst samotné sliny vykazují antibakteriální účinnost po dobu 5 hodin. Povrch ústní sliznice dokáže antibakteriálně působit až 12 hodin [62]. Tímto postupným uvolňováním je zajištěna dlouhodobá antibakteriální účinnost. Z tohoto důvodu je chlorhexidin součástí mnohých zubních past a ústních vod. Používá se také v prostředcích pro dezinfekci povrchů, operačních sálů a nástrojů, pro mytí rukou chirurgů, pro dezinfekci katétrů a omývání ran.

Výhodou chlorhexidinu je, že na něho nevzniká resistance a proto je jeho účinnost dlouhodobá. Tato účinnost je deaktivována aniontovými sloučeninami, včetně aniontových tenzidů (laurylsulfát sodný) běžně používaných jako detergenty v zubních pastách a ústních vodách. Z tohoto důvodu by se měl chlorhexidin používat k výplachu úst nejdříve 30 minut po použití jiného zubního produktu [63].

Toxicita a riziko vzniku přecitlivělosti na tento přípravek jsou minimální. Karcinogenní ani mutagenní účinky nebyly prokázány. Smrtelná (letální) dávka chlorhexidinu je  $LD_{50} = 2000 \text{ mg/kg}$  (orálně, potkan). To znamená, že člověk o hmotnosti kolem 70 kg by musel vypít 70 litrů 0,2% roztoku chlorhexidinu, což je koncentrace běžně obsažená v ústních vodách.

## 2.4 Kompozitní materiály

Kompozitní materiály představují široké spektrum materiálů, které na světovém trhu zauímají až 80 % objemu všech materiálů. Jsou to heterogenní materiály složené ze dvou nebo více fází, které se vzájemně výrazně liší svými mechanickými, chemickými či fyzikálními vlastnostmi. Jedna složka - matrice, zastává funkci pojiva, je spojitá a obvykle poddajnější a nese tvrdší, tužší a pevnější nespojitou složku, kterou označujeme jako plnivo. Přidávkou různých plniv můžeme ovlivnit požadované vlastnosti materiálu a eliminovat ty nežádoucí.

Pro kompozitní materiály je charakteristický tzv. synergismus, což znamená, že vlastnosti kompozitu jsou lepší, než by odpovídalo pouhému poměrnému sečtení vlastností jednotlivých složek. Existence synergismu je velice významná, neboť vede k získávání materiálů s kvalitativně zcela novými vlastnostmi. Typickým příkladem synergického efektu je kompozit složený z keramické matrice ( $Al_2O_3$ ) vyztužený keramickými vlákny ( $SiC$ ). I když

jsou samostatně jak matrice, tak plnivo velmi křehké, výsledný kompozit je charakteristický určitou mírou houževnatosti, tzn. odolnosti proti náhlému křehkému porušení [64].

Přípravou kompozitního materiálu dochází k významnému zlepšení některých vlastností, mezi něž patří mechanické vlastnosti (síla, modul, rozměrová stálost), elektrická vodivost, retardace hoření, termická stabilita či chemická odolnost.

Kompozity se využívají nejen kvůli jejich specifickým užitným vlastnostem (mechanické či fyzikální vlastnosti), ale také kvůli úspoře materiálu (přídavek plniva).

Podle struktury můžeme kompozitní materiály rozdělit na [65]:

*Makrokompozity* – obsahují plnivo s velikostí příčného řezu 1-100 mm. Patří zde především materiály uplatňující se ve stavebnictví, např. železobeton.

*Mikrokompozity* – velikost příčného řezu plniva v mikrokompozitních materiálech je 1 – 100  $\mu\text{m}$ . Tyto materiály se hojně využívají ve strojírenství.

*Nanokompozity* – za nanokompozitní materiály označujeme ty, kde alespoň jeden rozměr plniva je menší než 100 nm. Tyto materiály mají velmi široké využití např. v lékařství (antiseptické materiály, tkáňové inženýrství), v potravinářství či elektrotechnice.

Složka tvořící plnivo může mít částicový, vláknový či plošný charakter. Podle materiálu matrice rozlišujeme kompozitní materiály s kovovou, polymerní, keramickou nebo anorganickou maticí.

#### 2.4.1 Jílové polymerní nanokompozitní materiály

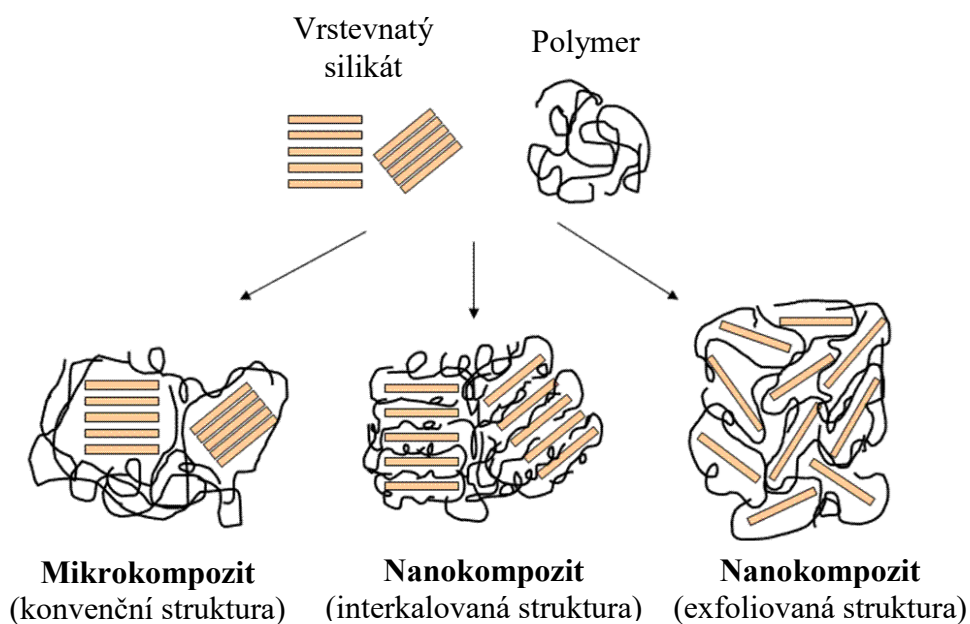
V současnosti je velká pozornost věnována nanokompozitním materiálům na bázi jílových a polymerních materiálů. Polymerní matrice zde obklopuje nanoplnivo, kterým je jílový minerál, jenž má alespoň jeden rozměr v řádu jednotek či desítek nanometrů. Důležitou roli zde hraje čistota, chemické složení, velikost povrchu (dosahující několik set  $\text{m}^2/\text{g}$ ) a iontová výměnná kapacita použitého minerálu, která ovlivňuje konečné nanokompozitní vlastnosti. Jako hostující molekuly se mohou mimo jílových materiálů uplatňovat také látky organické (barviva, antibakteriální látky) i anorganické ( $\text{TiO}_2$ , CdS).

Struktura jílových polymerních nanokompozitů je klasifikována podle stupně interkalace či exfoliace polymerního řetězce do mezivrstev jílu (Obr. 12) [66].

*Konvenční struktura* – vzniká v případě, kdy je nemodifikovaný jílový minerál podroben interakci s organickým polymerem a polymer není schopen se interkalovat do mezivrstev jílového minerálu. Ten zůstává v původním stavu, je obklopen polymerní maticí a působí jako mikroplnivo.

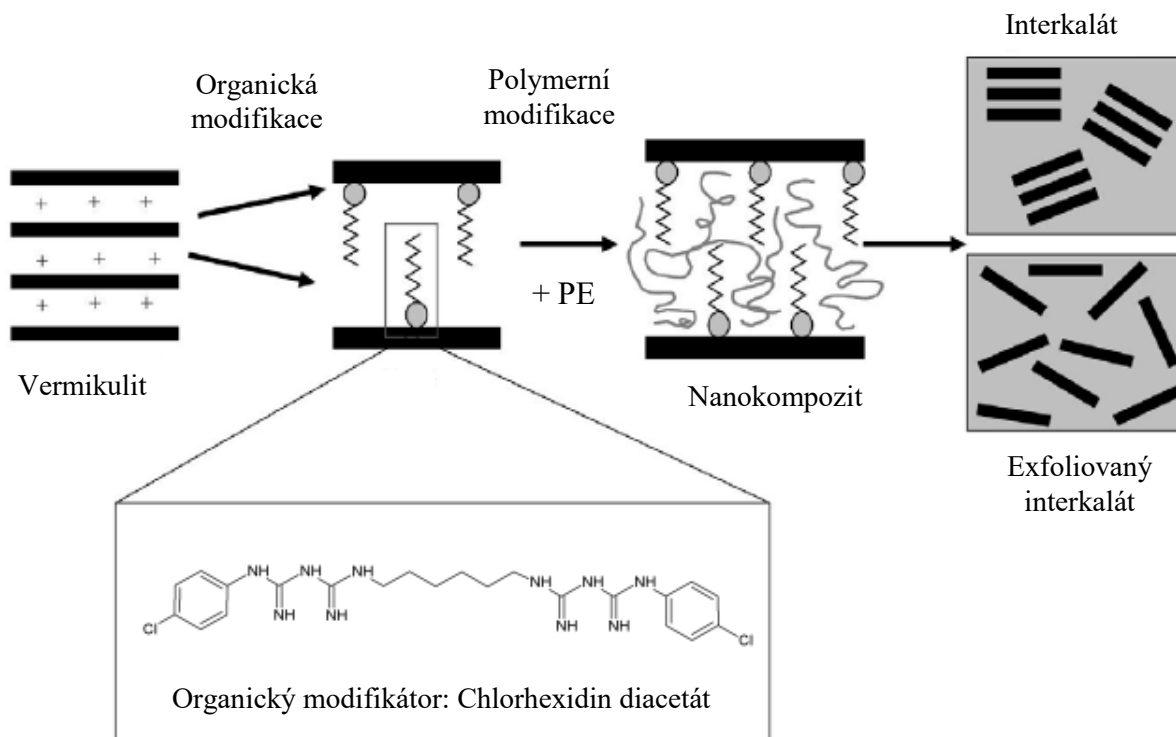
*Interkalovaná struktura* – polymerní řetězce pronikají do mezivrstev jílu, čímž dochází k mírnému poklesu elektrostatických sil mezi vrstvami, které mají za následek existenci periodického uspořádání vrstev.

*Exfoliovaná struktura* – polymerní řetězce způsobí separaci jednotlivých vrstev jílového minerálu, které jsou poté individuálně rozptýleny v matrici. Vzniká tak velký reakční prostor mezi jílovým minerálem a polymerem, což vede k významnému zlepšení vlastností nanokompozitu. Exfoliovaná struktura vzniká v případě rozšíření mezivrstevního prostoru jílového minerálu na více než 80-100 Å (8-10 nm).



**Obr. 12.** Schéma klasifikace struktur vrstevnatých polymerních kompozitů (převzato a upraveno dle [66]).

Syntézu nanokompozitu s nemodifikovaným jílovým minerálem ve vodném prostředí lze uskutečnit jen u malé skupiny velmi polárních polymerů. Proto byly hledány metody modifikace (organofilizace), které by umožnily použití jílových minerálů pro méně polární až nepolární polymery [71] (Obr. 13). Cílem bylo nejen hydrofobizovat povrch vrstev silikátu, ale i zvýšit jejich exfoliaci a zabezpečit tak interakce mezi jílovým minerálem, modifikátorem a polymerem, aby výsledný nanokompozit byl termodynamicky stabilní. Jednou z možností je využití jílových nanokompozitních materiálů v medicíně, avšak samotný jílový minerál ani polymerní matrice žádné antibakteriální vlastnosti nemají. Z tohoto důvodu se jako modifikátory pro organofilizaci používají látky s antibakteriální aktivitou. Chlorhexidin je právě jednou z těchto látek. Takto vzniklý nanokompozit poté vykazuje lepší fyzikálně-chemické vlastnosti a zároveň má antibakteriální účinky.



**Obr. 13.** Schéma organofilizace vermikulitu a jeho následná interkalace v polymeru [67].

#### 2.4.1.1 Příprava nanokompozitů polymer/fylosilikát

##### *In situ interkalační polymerizace*

Metoda interkalační polymerizace *in situ* byla poprvé použita pro syntézu polymer/jílových nanokompozitů již na začátku 90. let [68]. Nyní představuje tradiční způsob přípravy spočívající v nabobtnání organojílu v příslušném monomerním roztoku. Polární monomerní molekuly difúzí pronikají mezi vrstvy jílu. Následná polymerace monomeru může být iniciována zvýšenou teplotou, zářením či katalyzátorem [69, 70].

Metoda je časově náročnější, jelikož samotné bobtnání je závislé na polaritě monomeru, povrchové úpravě organojílu a samotné teplotě bobtnání.

##### *Interkalace v roztoku*

Tato metoda využívá rozpouštědla, ve kterém je polymer rozpustný a jílové vrstvy v něm bobtnají. V prvním kroku dochází k bobtnání jílového minerálu v rozpouštědle. Ve stejném rozpouštědle se nechá rozpustit také použitý polymer. Poté se oba roztoky smíchají, polymerní řetězce interkalují a dochází k vytlačení rozpouštědla z mezivrstevního prostoru jílu. Po úplném odstranění rozpouštědla (vakuové odpařování) se interkalovaná struktura zachová. Tato metoda je vhodná pro interkalaci polymerů s nízkou nebo žádnou polaritou [70].

### *Interkalace tavením*

Poslední dobou je interkalace tavením hojně využívaný způsob přípravy polymerních nanokompozitů s jílovým plnivem. Tato metoda zahrnuje zahřátí směsi polymeru a organicky modifikovaného jílu nad teplotu měknutí polymeru. Při zahřátí se polymerní řetězce rozptylují mezi vrstvy jílu. Podle stupně pronikání těchto polymerních řetězců mezi vrstvy získáváme nanokompozity s interkalovanou až exfoliovanou strukturou [70].

Tuto metodu můžeme považovat za jednu z nejšetrnějších, jelikož nevyužívá organických rozpouštědel. To z ní dělá samozřejmě také ekonomicky přitažlivou a průmyslově využitelnou metodu přípravy.

## **2.5 Antibakteriální testování**

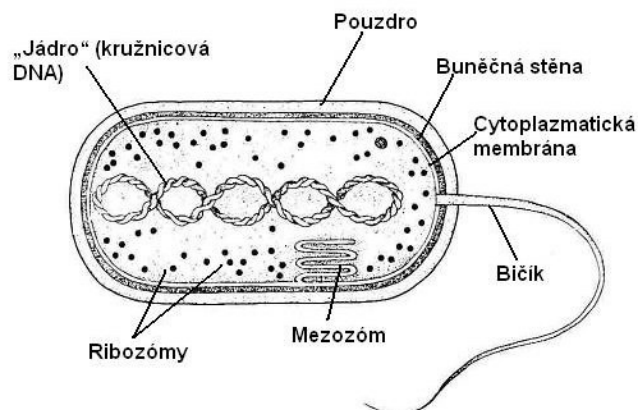
### **2.5.1 Bakterie - obecně**

Bakterie jsou nejrozšířenější skupinou organismů na světě. Celkově se odhaduje, že na Zemi žije asi  $5 \times 10^{30}$  (jedinců) bakterií. Celkový počet druhů se dá jen tušit, odhady sahají od  $10^7$  k  $10^9$  druhů. Bakterie je možné nalézt v půdě, vodě, ovzduší, i jakožto symbionty uvnitř a na povrchu mnohobuněčných organismů.

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy nejčastěji kulovitěho (koky) nebo protáhlého (tyčinky) tvaru. Jejich velikost je dosti rozmanitá a pohybuje se obvykle mezi desetinami a desítkami mikrometrů. Rozmnožují se příčným dělením nebo pučením. Některé bakterie vytvářejí spory, tedy zvláštní buňky, které dlouhodobě přežívají za nepříznivých podmínek (var, kyselé prostředí, radiace, přítomnost dezinfekční látky) [71].

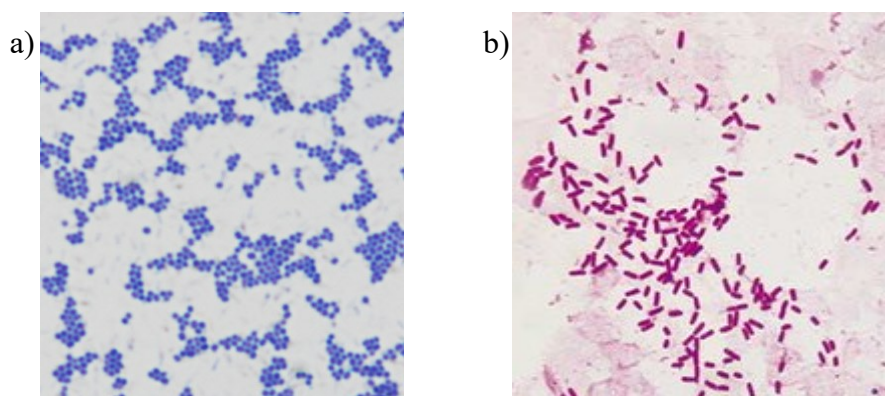
Stavba bakteriální buňky (Obr. 14) je jednodušší než u organismu eukaryotních. Cytoplasma bakteriální buňky je obklopena cytoplasmatickou membránou, na kterou obvykle nasedá pevná bakteriální stěna. Na jejím povrchu může být bakteriální pouzdro nebo vrstva slizu. Z povrchu některých bakterií vystupují bičíky, případně submikroskopické výběžky zvané pili neboli fimbrie. Cytoplasma obsahuje nukleoid (kruhovitá makromolekula DNA), ribozomy a inkluzní tělíska, vakuoly nebo granula [72].





**Obr. 14.** Schéma prokaryotické buňky typické pro bakterie [73].

Určování bakterií má velký význam v medicíně, kde je na správné identifikaci původce dané bakteriální infekce podmíněna následující léčba. Proto byly vyvinuty k identifikaci bakterií různé determinační techniky. Ze spousty barvicích postupů je velmi osvědčeným postupem tzv. diagnostické barvení podle Grama. Tento dánský lékař objevil, že se bakterie dají rozdělit do dvou skupin na základě schopnosti či neschopnosti obarvených buněk podržet si barvivo v přítomnosti alkoholu nebo acetonu. Při tomto barvení se preparát bakterií nejprve barví krystalovou violetí, která bakteriální buňky obarví tmavomodře. Poté se přidá Lugolův roztok, což vede ke vzniku komplexu barviva s jodem. Následuje působení alkoholu. Některé bakterie si komplex krystalové violeti s jodem podrží (gram-pozitivní,  $G^+$ ) a zůstanou tmavomodré [78] (Obr. 15a), jiné se odbarví (gram-negativní,  $G^-$ ) a je třeba je dobarvit kontrastním barvivem, např. zředěným fuschinem, ty jsou pak červené [79] (Obr. 15b).

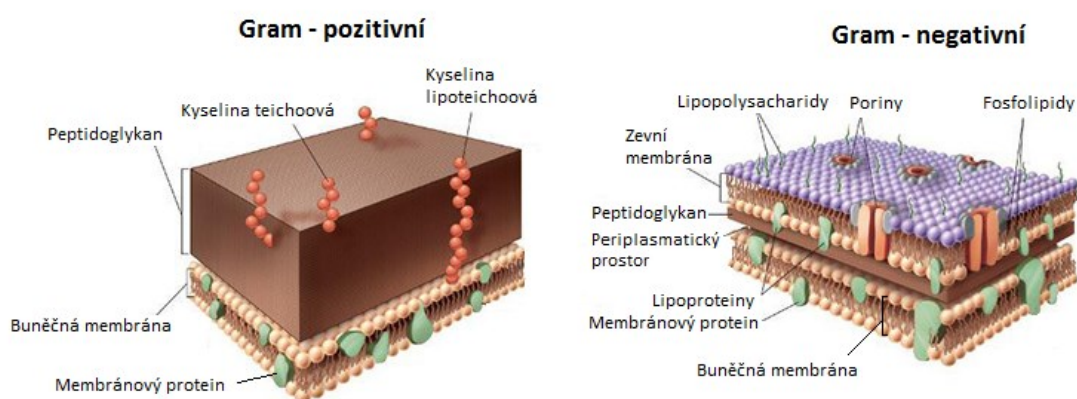


**Obr. 15.** Diagnostické barvení: a) gram-pozitivní koky [74] a b) gram-negativní tyčinky [75].

Podstata Gramova barvení souvisí se stavbou bakteriální stěny (Obr. 16) [79]. U gram-pozitivních bakterií je buněčná stěna stavěna poměrně jednoduše. Tvoří ji mohutná peptidoglykanová vrstva, v níž jsou polysacharidové řetězce uloženy v mnoha vrstvách nad

sebou a touto vrstvou kolmo k povrchu buňky prostupují strukturu řetězce kyseliny teichoové. Tato vrstva se po dehydrataci alkoholem smrští, což zpomalí únik komplexu krystalové violeti s jodem z gram-pozitivních buněk.

Buněčná stěna gram-negativních bakterií je složitější, i když je tenčí. Skládá se ze zevní membrány a pod ní uloženého peptidoglykanu. Ten je tenký, prakticky jednovrstevný, obsahuje kyselinu diaminopimelovou a je součástí periplasmatického prostoru, který se nachází nad cytoplasmatickou membránou. Zevní membrána obsahuje fosfolipidy, lipopolysacharidy a proteiny. Tato membrána brání prostupu řady molekul, jako jsou některá barviva (krystalová violet) či antibiotika, která jinak snadno pronikají stěnou gram-pozitivních buněk [72].



**Obr. 16.** Schematické porovnání stavby bakteriální stěny gram-pozitivních a gram-negativních bakterií [75].

### 2.5.2 Kultivace bakterií

Pojmem kultivace se rozumí množení bakterií v laboratorních podmínkách, při kterých se bakterie nacházejí v umělém prostředí (kultivační médium, půda), kterým se snažíme pěstovaným mikroorganizmům nahradit jejich původní přirozené podmínky, jež jim poskytoval hostitelský organizmus. K tomu, aby růst, množení a metabolismus bakterií byl na umělých půdách optimální, musí být splněno několik základních podmínek (zdroj živin, kultivační atmosféra, teplota, vlhkost prostředí, osmotický tlak, reakce prostředí – pH, oxidačně-redukční potenciál), přičemž každý bakteriální druh má specifické podmínky růstu. Kultivační média dělíme dle konzistence na tekutá a pevná, která obsahují ztuzující složku – agar. Tekutá média (bujóny) používáme pro pomnožování bakteriálních kmenů, přičemž ve výsledku nelze rozlišit jednotlivé druhy. Na pevných médiích dochází k tvorbě kolonií, což jsou útvary vzniklé pomnožením buněk [76].

Důležité je si uvědomit, že ne z každé buňky ve vzorku naroste skutečně kolonie - kultivačními metodami obecně nelze nikdy zachytit absolutně veškeré přítomné

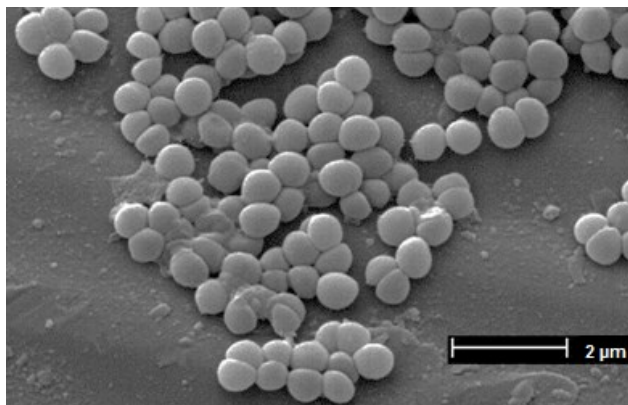
mikroorganismy. Na druhé straně některé kolonie mohou vyrůst nikoliv z jediné buňky, ale z více neoddělitelných buněk, např. z aglomerátu bakteriálních či kvasničných buněk či z částí mycélia plísní. Proto se nikdy výsledný počet mikroorganismů ve vzorku, zjištěný kultivační metodou, nevyjadřuje jako „počet buněk“ či „počet zárodků“, ale jako počet „formujících se jednotek“ (*angl.* colony forming units, CFU) a vyjadřuje celkový počet životaschopných buněk. Českým ekvivalentem výrazu CFU je KTJ = kolonie tvořící jednotky. Stanovuje se plotnovými metodami, kdy zkoumaný vzorek se nanese na Petriho misku s pevným médiem a po inkubaci se spočítají vytvořené kolonie. [77].

### 2.5.3 Klinicky významné bakteriální kmeny

V rámci této disertační práce byla testována antibakteriální účinnost připravených vzorků proti vybraným gram-pozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) a gram-negativním (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriálním kmenům.

#### 2.5.3.1 *Staphylococcus aureus* – zlatý stafylokok

*Staphylococcus aureus* je nejvýznamnějším druhem rodu *Staphylococcus* (čeleď *Staphylococcaceae*). Je to fakultativně anaerobní, nepohyblivý, gram-pozitivní kok. Bakterie mají velikost 0,7 – 0,9  $\mu\text{m}$  a nejčastěji vytváří hroznovité shluky (Obr. 17).



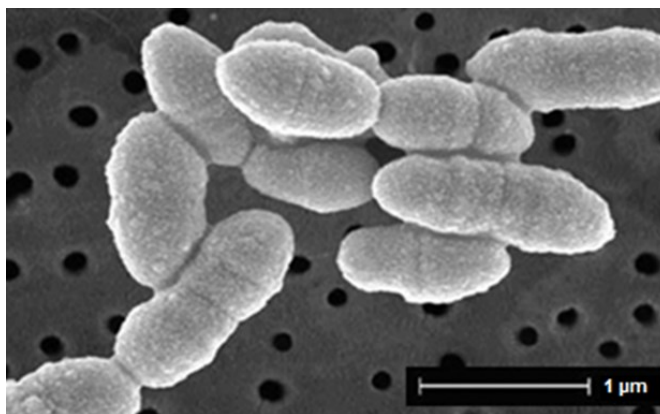
**Obr. 17.** Snímek SEM bakterie *Staphylococcus aureus* [78].

Velmi často způsobuje různé infekce v rozsahu od mírných zánětů kůže a měkkých tkání až po život ohrožující sepsi („otravy krve“, směřující až do septického šoku spojeného se selháváním orgánů). Patogenita této bakterie je výsledkem produkce toxinů (exfoliativní toxiny, enterotoxiny, atd.), které způsobují ničení tkáně nemocného. Tvoří zlatožlutý pigment (od toho odvozeno druhové jméno *aureus* - zlatý), zkvašuje manitol a přibližně u třetiny lidské populace je přirozeně přítomen na kůži a sliznicích.

Celosvětovým problémem se stal výskyt kmenů *S. aureus* rezistentních k oxacilinu (meticillin-rezistentní *S. aureus* = MRSA), antibiotiku používaného především při léčbě nozokomiálních infekcí. Bakterie *S. aureus* mají schopnost během růstu tvořit exopolysacharidy – slizy. Pomocí adhesinu se mohou vázat na vhodný povrch a následným pomnožením vytvořit mnohvrstevný biofilm. Biofilmy představují závažný problém, jak ve zdravotnictví, tak v potravinářském průmyslu. Rizikem je především vysoká odolnost biofilmů k antimikrobiálním látkám, čistícím a desinfekčním prostředkům a možnost přenosu genů rezistence mezi buňkami biofilmu [79].

### 2.5.3.2 *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* (rod *Enterococcus*, čeleď *Enterococcaceae*) patří mezi gram-pozitivní koky s oválným až lehce protáhlým tvarem (Obr. 18). Uspořádání bývá ve dvojicích, drobných shlucích nebo krátkých řetězcích. Jsou fakultativně anaerobní.

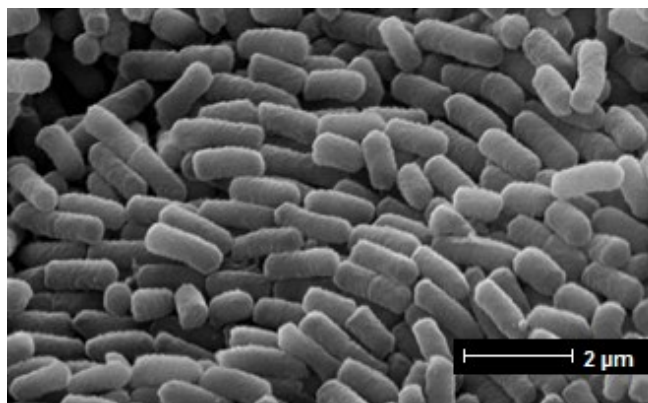


Obr. 18. Snímek SEM bakterie *Enterococcus faecalis* [80].

Jak naznačuje jejich název, enterokoky tvoří součást střevní flóry. Patří mezi závažné podmíněné patogeny, infekce jimi způsobené jsou často nozokomiální. Enterokokové infekce jsou u člověka přibližně v 90 % vyvolány právě *E. faecalis*. Tyto infekce jsou časté u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů se zavedenými močovými a intravaskulárními katétry. Enterokoky jsou rovněž původci infekcí močových cest [79].

### 2.5.3.3 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (rod *Escherichia*, čeleď *Enterobacteriaceae*) je fakultativně anaerobní, nesporotvorná, krátká tyčinka, pohyblivá díky přítomnosti peritrichálních bičíků. *Escherichia coli* patří mezi významné zástupce gram-negativních bakterií (Obr. 19).



**Obr. 19** Snímek SEM bakterie *Escherichia coli* [81].

Vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích. Velikost vegetativních buněk je v průměru 1-1,5 x 2-6 μm. Na povrchu buňky se vyskytují různé druhy fimbrií, které bakteriím umožňují adhezenci k hostitelským buňkám (např. střevní epitel).

*E. coli* patří ke střevní mikroflóře teplokrevných živočichů, včetně člověka. Z tohoto důvodu je její přítomnost v pitné vodě indikátorem fekálního znečištění. Člověku je jako součást přirozené mikroflóry prospěšná, jelikož produkuje řadu látek, které brání rozšíření patogenních bakterií (koliciny) a podílí se i na tvorbě některých vitamínů (např. vitamíny K a B).

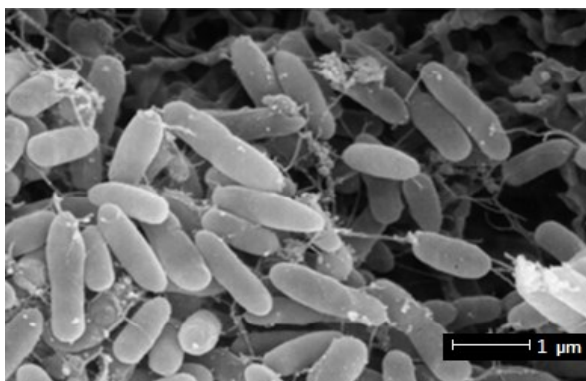
*E. coli* patří k nejlépe prostudovaným mikroorganismům, jelikož je modelovým organismem pro genové a klinické studie [79].

Většina kmenů *E. coli* je za běžných podmínek nepatogenní, dokonce jsou užitečnými komensály střevního traktu lidí a zvířat. Za určitých okolností nabývají úlohy vyslovených patogenů, zejména při invazi do orgánů souvisejících se střevním traktem (apendix, žlučový měchýř, vývodné močové cesty). V těchto orgánech působí akutní i chronické procesy, a to obvykle hnisavého charakteru.

#### 2.5.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (rod *Pseudomonas*, čeleď *Pseudomonadaceae*) je mírně zahnutá, štíhlá gram-negativní tyčinka (Obr. 20). Tyto bakterie jsou většinou pohyblivé a pro řadu z nich je typické vydávání specifického zápachu. *Pseudomonas aeruginosa* představuje jednoznačně nejčastěji izolovaný a klinicky nejvýznamnější druh [82]. V přírodě je velmi rozšířenou bakterií, nachází se na povrchu lidského těla, zejména na sliznici střevního traktu, ale i mimo lidské tělo, hlavně v odpadních vodách.





**Obr. 20** Snímek SEM bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [83].

Ve velkém množství může zamořovat nemocniční prostředí, kde kontaminuje katétry, infuzní roztoky, kanyly apod. Náleží k obávaným původcům nosokomiálních nákaz. *P. aeruginosa* může způsobit infekci jakéhokoli orgánu či systému těla. K těm nejobávanějším patří infekty popálenin (úmrtnost z těchto sepsí je kolem 60 %), sepse novorozenců a infekce oka. Terapie u pseudomonádových infekcí bývá těžká. Tato bakterie je totiž mistrem ve schopnosti přijímat od jiných mikrobů geny kódující mnohočetnou rezistenci k antibakteriálním látkám a předávat je dalším kmenům. Takto dochází k šíření polyrezistentních kmenů po klinikách [79]. Léčba zánětů vyvolaných *P. aeruginosa* je velmi svízelná pro primární rezistenci bakterie na chemoterapeutika a antibiotika. Účinným antibiotikem bývá pouze gentamycin a polymyxin.

#### **2.5.4 Mechanismus antibakteriálního působení organo-jílového materiálu**

V literatuře byly popsány dva mechanismy antibakteriálního účinku. První zahrnuje adsorpci bakterií z roztoku a jejich navázání na povrch jílové matrice. Druhý mechanismus účinku spočívá v uvolnění antibakteriální látky z povrchu jílové matrice a její přímý vliv na bakterie v roztoku [84].

Mechanismus antibakteriálního účinku byl potvrzen při desorpčním experimentu, kdy po promytí organo-jílového kompozitu docházelo na povrchu promytých částic stále k redukci bakterií, zatímco v promytém roztoku nikoli. Dalším poznatkem důležitým pro vznik mechanismu účinku byl fakt, že povrch vrstev jílového minerálu stejně jako stěny bakteriální buňky (esterové skupiny) mají negativní náboj. K navázání buněk bakterií na povrch jílového minerálu by bylo zapotřebí překonat velkou energetickou bariéru. Proto jílové minerály modifikujeme vhodnými organickými molekulami, které mají kladný náboj. Povrch jílového minerálu se tak stává pozitivním a pomocí elektrostatických sil jsou přitahovány negativně nabitě bakterie.

Mechanismus antibakteriálního účinku chlorhexidinu byl popsán v jednotlivých po sobě následujících krocích [85]. Proces začíná adsorpcí chlorhexidinu na bakteriální buněčný povrch, následuje difúze skrz buněčnou stěnu, navázání na cytoplazmatickou membránu, protržení cytoplazmatické membrány, uvolnění cytoplazmatického obsahu a nakonec dochází k usmrcení buňky.

## 2.6 Organo - anorganické hybridní materiály s antibakteriálními vlastnostmi

Organo-anorganické hybridní nanokompozitní materiály patří do nové a rychle se rozvíjející oblasti materiálového výzkumu. Jejich příprava je založena na modifikaci struktur anorganických nosičů různými organickými sloučeninami. Vhodnou kombinací jednotlivých složek, až na molekulární úrovni, lze dosáhnout unikátních vlastností výsledného materiálu, které jsou známy jako antibakteriální nanomateriály, polymerní nanokompozity, sorbenty, léčiva (lékové formy), kompozitní nanomateriály pro katalýzu organických reakcí, apod.

Snadno dostupné a cenově výhodné jílové minerály v kombinaci s organickou antibakteriální složkou jsou výchozími materiály pro vznik nových nanokompozitních antibakteriálních materiálů, které v dnešní době zaujímají přední místo vědeckých výzkumů.

He a kol. [86] připravili organo-anorganický materiál chlorhexidin (CA)-montmorillonit a zjistili závislost antibakteriálních účinků na obsahu antibakteriální složky – chlorhexidinu. Výsledné organomontmorillonity prokázaly dlouhotrvající antibakteriální efekt po dobu 1 roku od přípravy vzorku. Toto zjištění bylo velmi důležitým poznatkem pro praktické uplatnění těchto antibakteriálních materiálů v praxi.

Podobný organo-anorganický hybridní materiál CA-montmorillonit byl připraven a testován na antibakteriální účinnost [85]. Uvolňování účinného CA z montmorillonitové matrice bylo hodnoceno spolu s antibakteriální aktivitou testovanou na bakteriálních kmenech *S. aureus* a *P. aeruginosa*. K největšímu uvolňování CA (24 hm. %) docházelo během 24 hod, pak bylo uvolňování kontinuální po dobu 72 hod, přičemž maximální úbytek nepřesáhl 30 hm. % během celého experimentu. Počáteční množství uvolněného CA bylo připisováno molekulám CA sorbovaným na povrchu montmorillonitu. Antibakteriálního působení bylo popsáno dvěma možnými mechanismy. První mechanismus předpokládá imobilizaci bakterií přímo na povrchu montmorillonitu. Po interkalaci molekul CA s pozitivním nábojem dochází k hydrofobizaci povrchu montmorillonitu a vzniku organo-anorganického hybridního materiálu s pozitivním nábojem. Negativní náboj na povrchu bakteriální buňky interaguje k pozitivně

nabitému povrchu organo-anorganického hybridního materiálu. Druhý mechanismus předpokládal uvolnění antibakteriálního činidla z montmorillonitové matrice a uplatnění jeho antibakteriálního efektu přímo v roztoku. Při testování antibakteriální aktivity zónovou inhibiční reakcí byl potvrzen vznik těchto inhibičních zón a bylo potvrzeno uvolňování a účinek chlorhexidinu z organo-montmorillonitu.

Organo-anorganický chlorhexidin-Na montmorillonit byl připraven interkalací s použitím koncentrace chlorhexidinu v násobném množství 0,2 – 2 kationtové výměnné kapacity (CEC) montmorillonitu [87]. Pomocí energiově disperzní analýzy byla studována přítomnost a distribuce chlorhexidinu na povrchu montmorillonitu. Testy antibakteriální účinnosti neprokázaly antibakteriální účinek pouze u vzorku s nejslabší koncentrací chlorhexidinu (0,2 x CEC montmorillonitu). Studium uvolňování CA z chlorhexidin-Na montmorillonitu byl použit vzorek s koncentrací chlorhexidinu odpovídající dvojnásobné kationtové výměnné kapacitě (2 x CEC) montmorillonitu. Nejvyšší uvolňování bylo zaznamenáno během prvních 18 hod, poté bylo uvolňování postupné a nepřekročilo 84 % obsahu chlorhexidinu. Zbývající množství chlorhexidinu bylo vázáno na interkalované kationty v mezivrstvi montmorillonitu.

Ambrogi a kol. [88] připravili tenký film organo-anorganického hybridního kompozitu montmorillonit-chitosan-chlorhexidin, za účelem zamezení vzniku bakteriálního biofilmu postupným uvolňováním CA při léčení ran. U tohoto kompozitního filmu docházelo během prvních 30 min k největšímu uvolňování navázaného CA (40 hm. %). Po 8 hodinách bylo uvolnění CA 50 %, a po 24 hodinách 85%. Vzorky montmorillonit-chitosan-chlorhexidin filmů vykazovaly antibakteriální aktivitu a žádnou cytotoxicitu. Připravené vzorky mohou být uplatněny v léčebných aplikacích, ať už jako nosiče aktivních látek či krycí filmy pomáhající hojení ran.

Organo-anorganické hybridní nanokompozitní materiály ve vzorcích CA-montmorillonit a CA-vermikulit byly připraveny také za účelem porovnání jejich antibakteriální účinnosti. Mezivrstevní materiál ve strukturách montmorillonitů a vermikulitů byl před interkalací CA kationtově vyměněn kationty  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Ag}^{+}$ ). Oba typy vzorků na bázi chlorhexidin-montmorillonit a chlorhexidin-vermikulit vykazovaly po 24 hod testování dobrou účinnost proti bakteriálnímu kmeni *E. coli*. Organo-anorganické hybridní nanokompozitní materiály typu CA-vermikulitu vykazovaly vyšší antibakteriální účinnost na *E. faecalis* [89].

Netradiční použití vermikulitu do CA-anorganických hybridních kompozitů požadovalo podrobnější studium a získání poznatků o vlastnostech těchto kompozitů. Za tímto účelem byly



hodnoceny postupy přípravy vzorků interkalací chlorhexidinu do vermikulitové matrice [90]. Bylo připraveno 5 vzorků s různou koncentrací chlorhexidinu CA (0,2; 1; 2; 3; 4) odpovídající násobkům CEC vermikulitu. Připravené CA-vermikulity byly charakterizovány řadou analytických metod a byla testována jejich antibakteriální schopnost. Překvapivých výsledků dosáhly vzorky s nízkým obsahem CA, které vykazovaly dobrý antibakteriální účinek proti *E. coli* i *E. faecalis*, avšak proti velmi odolné *P. aeruginosa* měly inhibiční efekt velmi nízký.

V případě využití CA-vermikulitu s dlouhodobým antibakteriálním efektem v lékařství, např. v léčbě místních zánětů v dutině ústní, bylo nutné posouzení účinků vermikulitu pro živý organismus. Holešová a kol. [91] publikovali výsledky toxikologické studie *in vivo*, při níž byl sledován vliv orální aplikace vermikulitu na gastrointestinální trakt. Po provedení histologických zkoušek vzorků ústní tkáně, jazyka, žaludku, jater a dalších vzorků malých savců (laboratorní krysy) bylo zjištěno, že vermikulit nevyvolal žádnou systémovou či lokální reakci a byly vyloučeny toxické účinky vermikulitu na živý organismus.

Mnohé, podobně připravované antibakteriální organojíly slouží jako plnivo pro přípravu antibakteriálních polymerních nanokompozitních materiálů [67, 85].

### 2.6.1 Stabilita chlorhexidinu v organo-jílovém kompozitu

Z hlediska praktického využití antibakteriálních organo-jílových kompozitů jsou velmi důležité dlouhodobé účinky závislé na schopnosti udržet antibakteriální složku v matrici jílového minerálu pokud možno co nejdelší dobu.

Využití vermikulitu jako nosiče pro postupné uvolňování CA studovali Xu a kol. [92]. Provedli testy stability a antibakteriálních účinků. Stabilita CA-vermikulitových kompozitů byla zkoumána procesem uvolňování CA v dialyzačním vaku za přítomnosti fosfátového pufru o pH 4 a 7, kterými simulovali prostředí v lidském těle. *In vitro* studie ukázala, že uvolňování CA z CA-vermikulitu je pomalé a postupné. V průběhu 24 hod bylo v roztoku o pH 7 uvolněno přibližně 58 % interkalovaného CA a 61 % bylo uvolněno v roztoku s pH 4. Maximální množství uvolněného CA bylo 65 % a zůstalo po dobu 96 hod experimentu nezměněno. Dle autorů by vermikulit mohl sloužit jako účinný nosič léčiv s prodlouženým účinkem uvolňování. Antibakteriální aktivita byla stanovena pomocí zónového testu, který ukázal, že připravené CA-vermikulity byly vysoce účinné proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím.

Proces uvolňování CA z anorganické matrice montmorillonitu sledovali také Meng a kol. [85]. Zjistili, že při pH = 7,4 a teplotě 37 °C došlo k prudkému uvolnění CA (asi 24 hm. %) během prvních 24 h. Rychlost uvolňování CA se však během následujících 48 h

stabilizovala a po 72 h měření bylo zjištěno, že bylo uvolněno 31 % CA z montmorillonitové matrice. Autoři připisují množství uvolněného CA, který byl adsorbován na povrchu montmorillonitu nebo v mezivrstvích. Připravené vzorky vykazovaly dobrou antibakteriální účinnost proti široké škále mikroorganismů, zahrnující jak gram-pozitivní, tak i gram-negativní bakteriální kmeny.

Onnainty a kol. [93] rovněž sledovali proces uvolňování CA ze dvou matric, a to montmorillonitu a kompozitu montmorillonitu a chitosanu. Samotný proces probíhal při třech různých hodnotách pH 1,2; 4,2 a 6,8. Autoři sledovali rovněž uvolňování čistého CA, které bylo dle očekávání velmi rychlé a dosáhlo 100 % po 24 h ve všech třech hodnotách pH. Naopak proces uvolňování CA z matric CA-montmorillonitu a kompozitu CA-montmorillonitu s chitosanem byl velmi pozvolný. Po 24 h se uvolnilo asi 24 % CA z matrice CA-montmorillonitu a necelých 10 % z matrice CA-montmorillonitu s chitosanem.

Dlouhodobý proces uvolňování CA z matrice montmorillonitu sledoval i Wu a kol. [94]. V této studii byl CA navíc modifikován  $\text{Cu}^{2+}$  ionty pro lepší ukotvení v montmorillonitu. Uvolňování komplexu Cu-CA bylo sledováno ve velmi dlouhém intervalu 288 h. Po uplynutí této doby bylo zjištěno uvolnění pouhých 16 % z celkového komplexu Cu-CA. Nejrychleji byl uvolněn Cu-CA během prvních 6 h, kdy bylo uvolněno množství Cu-CA z povrchu. Výsledné antibakteriální testy potvrdily účinnost připravených nanokompozitů jak vůči *E. coli*, tak proti *S. aureus*.

Jak již bylo řečeno, chlorhexidin je velmi využívaná látka pro své široké antibakteriální účinky. Běžně se používá v dentální hygieně jako prevence zubního plaku. V případě, že by se mělo využití chlorhexidinu rozšířit mimo dutinu ústní, je zapotřebí zajistit řízené uvolnění chlorhexidinu z použité matrice. Kromě jílových minerálů lze pro řízené uvolňování chlorhexidinu použít jako matrice amorfní mikroporézní siliku [95], metakrylát [96], různé strukturní tekuté krystaly [97], materiály používané pro umělé kosti [98] atd.

### **2.6.2 Organo-jílové nanokompozitní polymerní materiály s antibakteriálními účinky**

Během posledních desetiletí je zájem o polymerní nanokompozity s vrstevnatými silikáty značně rostoucí. Především díky možnosti rozšířit či zlepšit ať už fyzikální, chemické či mechanické vlastnosti ve srovnání s tradičními plnivými kompozitů.

Nigmatullin a kol. [99] se zabývali přípravou polymeru (Nylon-6) s obsahem komerčně dostupného organojílu (montmorillonit modifikován kvartérními amonnými solemi).

Nanokompozitní materiál byl připraven tavením v tavicím stroji s rychlostí 400 ot./min. Výsledky antibakteriálního testování, které byly určeny na základě stanovení minimální inhibiční koncentrace (*angl.* minimal inhibition concentration, MIC), přinesly zajímavé poznatky. Použitá organická plniva, která obsahovala dlouhý řetězec, jsou více účinná než ta se dvěma dlouhými řetězci. Nicméně nejlepších výsledků, oproti vzorkům obsahujícím alifatický řetězec, dosáhl vzorek, jež obsahoval benzyl. Dále bylo na základě měření konduktivity zjištěno, že nejsilněji proti bakteriím působil vzorek, který uvolnil nejméně účinné látky. Z tohoto měření tedy vyplývá, že antibakteriální aktivita organojílů není způsobena pouze látkami uvolněnými z matrice do okolního např. vodného prostředí.

V další studii Pongprayoon a kol. [100] měli za cíl připravit antibakteriální ultratenký film na povrchu Na-bentonitu procesem admicelární polymerizace. Jedná se o proces, při kterém se syntetizuje polymerní film přímo v mezivrstvě vrstevnatého minerálu. Díky nízkým obsahům chemikálií potřebných pro formování polymerního nanofilmu a netoxickým organickým rozpouštědly, jež jsou u výroby vyžadována, patří tato metoda k ekologicky příznivým, což je její velkou výhodou. Pro tuto studii byly vybrány tři monomerní prekurzory (dialyldimethyl ammonium chlorid, metylmetakrylát a vinylidín chlorid), které byly dále syntetizovány za vzniku polymerů, které již samy o sobě mají antimikrobiální účinek. Výše uvedeným způsobem vznikl polymerní film na Na-bentonitu, který má mnohonásobně větší povrch ve srovnání s nanokompozitním polymerem připraveným tavením. Všechny vzorky také vykazovaly antibakteriální účinnost. Takto připravené nanokompozitní filmy mohou sloužit jako obalový materiál pro ovoce a zeleninu.

Strukturu a antibakteriální vlastnosti polymerních kompozitů s vermikulitovou maticí studovala také Hundáková a kol. [101]. Ti ve své studii použili jako plnivo právě vermikulit v kombinaci s hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) v různých koncentracích. Na základě výsledků rentgenové difrakce (Rtg) a molekulového modelování zjistili, že alkylový řetězec HDTMA vytváří nepolární bezvodou oblast, která může usnadňovat vstup polyetylenového (PE) řetězce do mezivrstvy vermikulitu. Zároveň potvrdili antibakteriální chování nanoplňiva i výsledných polymerních kompozitů. Organovermikulitové nanoplňivo má dvě přednosti, nejen že působí antimikrobiálně, ale také zesiluje tahový modul pružnosti výsledného polymerního kompozitu ve srovnání s čistým PE.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

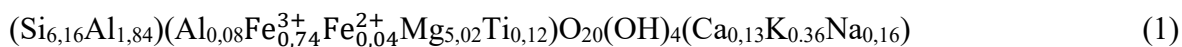
Příprava organojílů a většina experimentálních měření byla provedena na půdě Centra nanotechnologií (CNT-9360), VŠB-TU Ostrava. Stanovení obsahu organického uhlíku proběhlo ve spolupráci s Ústavem anorganické chemie, SAV, Bratislava.

Příprava a vyhodnocení struktury (skenovací elektronová mikroskopie) polyetylenových nanokompozitních desek proběhlo ve spolupráci s Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně a firmou SPUR, a. s. Zlín.

Antibakteriální aktivitu připravených práškových organojílů i nanokompozitních desek stanovoval Zdravotní ústav v Ostravě, Centrum klinických laboratoří.

#### 3.1 Vstupní materiály

Jako vstupní materiál byl v celé studii použit přírodní vermikulit (VER) z ložiska Santa Lucía, Brazílie (Grena, Česká republika). Tento materiál byl pomlet v kulovém mlýnu Retsch (20 min, 300 ot./min) a síťován na frakci  $< 40 \mu\text{m}$ . Na základě výsledků prvkové analýzy byl vypočítán krystalochemický vzorec vermikulitu (1):



Hodnota kationtové výměnné kapacity (CEC) vermikulitu byla určena na základě vyměnitelného  $\text{Cd}^{2+}$  iontu s hodnotou 1,06 meq/g, což odpovídá 106 cmol(+)/kg.

Dále byly použity chemikálie v analytické kvalitě: chlorhexidin diacetát (CA,  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{Cl}_2 \cdot 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , Sigma-Aldrich, ČR), chlorid zinečnatý ( $\text{ZnCl}_2$ , Vitrum, ČR), chlorid sodný (NaCl, Vitrum, ČR), etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Vitrum, ČR), kyselina chlorovodíková (HCl, Vitrum, ČR).

Pro přípravu nanokompozitních desek byl použit nízkohustotní polyetylen Bralen FB 2-17 (v textu označení PE).

#### 3.2 Metody identifikace a jejich přístroje

Struktura připravených organovermikulitů i PE desek byla studována pomocí rentgenové práškové difrakční analýzy (RTG). Složení a vazebné interakce vzorků byly charakterizovány infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (IČ). K popisu morfologie povrchu vzorku byl použit skenovací elektronový mikroskop (SEM) a rovněž byl stanoven obsah organického uhlíku (TOC) v připravených organovermikulitech.

Antibakteriální účinnost proti vybraným bakteriálním kmenům byla testována Zdravotním ústavem v Ostravě.

### **3.2.1 Rentgenová prášková difrakční analýza**

Záznamy rentgenové práškové difrakce jednotlivých vzorků byly pořízeny pomocí rentgenového práškového difraktometru INEL s širokouhlým pozičně citlivým detektorem CPS 120 (podmínky: reflexní mód, Ge-monochromátor,  $\text{CuK}\alpha 1$  radiace). Záznamy byly pořízeny v okolní atmosféře (25 °C, 43% vlhkost) za konstantních podmínek (2000 s, 35 kV, 20 mA). Vzorky byly upevněny v rotačním držáku a měření probíhalo 1500 s.

Některé práškové vzorky a PE desky byly měřeny pomocí rentgenového práškového difraktometru Ultima IV, RIGAKU ( $\text{CuK}\alpha$ , Ni  $\text{K}\beta$  filtr, uspořádání Bragg-Brentano) se scintilačním detektorem. Práškové vzorky byly vtlačeny do plochého skleněného držáku. Vzorky nanokompozitních desek byly umístěny do otvoru hliníkového držáku. Měření probíhalo v reflexním modu při 40 mA a 40 kV.

### **3.2.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací**

Infračervená spektra práškových vzorků byla změřena infračerveným spektrometrem s Fourierovou transformací NEXUS 470 (ThermoScientific, USA) s využitím KBr metody. Spektrometr je vybaven infračerveným Globar zdrojem a DTGS (deuterovaný triglycerinsulfát) detektorem. Měření probíhalo ve střední infračervené oblasti 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ , s rozlišením 4  $\text{cm}^{-1}$  a 128 skeny.

Infračervená spektra PE nanokompozitních desek byla měřena metodou zeslabeného úplného odrazu (angl. Attenuated Total Reflectance, ATR). Vzorek byl vložen a stlačen v tlakovém zařízení na diamantový ATR krystal s jednou reflexí. IČ spektra byla pořízena infračerveným spektrometrem NEXUS 470 (ThermoScientific, USA) vybaveném DTGS detektorem s ATR příslušenstvím. Měření probíhalo ve střední oblasti 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ , s rozlišením 8  $\text{cm}^{-1}$  a 512 skeny.

### **3.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie**

Skenovací elektronový mikroskop Quanta 450 Field Emission Gun, se studenou autoemisní katodou byl použit k vizuální charakterizaci morfologie povrchu připravených práškových vzorků.

PE nanokompozitní desky byly hodnoceny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu TESCAN VEGA/LMU na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Před měřením byly vzorky potaženy vrstvou Au/Pt. Pro pozorování byl vytvořen hladký lom v tekutém dusíku. Pozorování proběhlo ve vysokém vakuu, režim zrychlení na napětí 10 kV.

### 3.2.4 TOC analýza

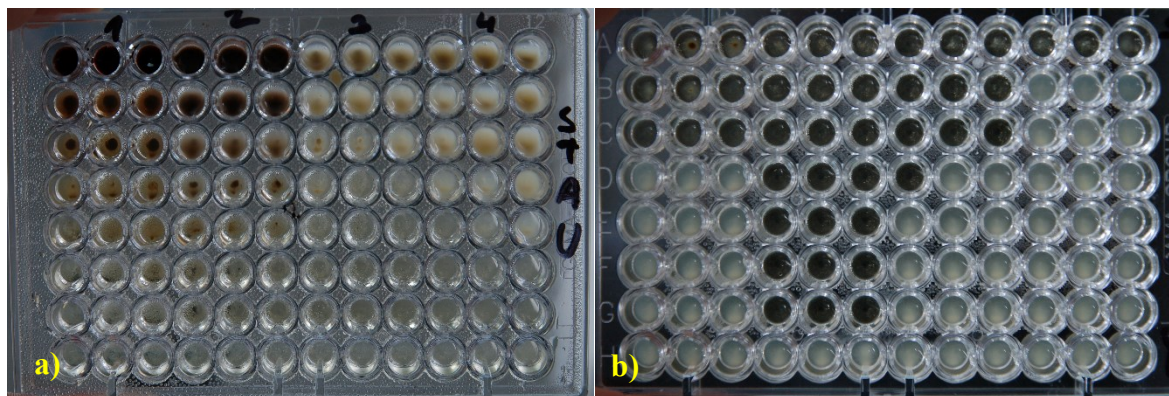
Ke stanovení obsahu celkového organického uhlíku byl použit analyzátor HORIBA EMIA-320V2. Spalování probíhalo v čistém kyslíku při cca 3 000 °C po dobu 60 s. Analýza byla provedena ve spolupráci se SAV Bratislava.

### 3.2.5 Antibakteriální testy

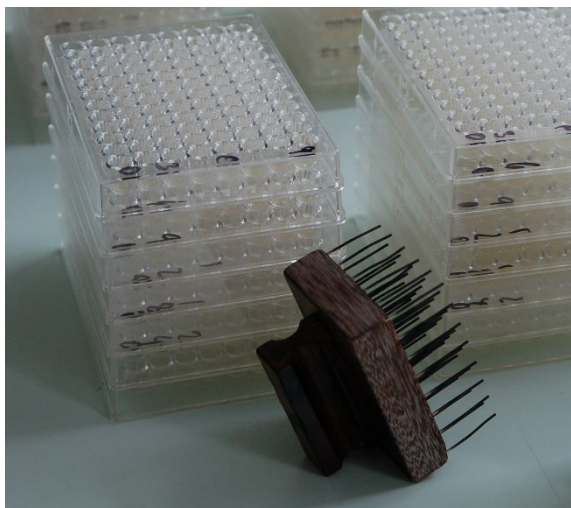
#### 3.2.5.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) práškových vzorků

Antibakteriální účinnost připravených vzorků byla stanovena pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace organojílů, která zcela zabraňuje bakteriálnímu růstu.

Ředění a kultivace byly provedeny na mikrotitrační desce s 96 jamkami. První série jamek obsahovala 10% vodnou disperzi vzorku organovermikulitu. Tato disperze byla dále zředěna trojkovou zředovací metodou v glukózním základu tak, že série jamek od druhé do sedmé obsahovaly vzorek o koncentraci 3,33 %; 1,11 %; 0,37 %; 0,12 %; 0,041 % a 0,014 %. Osmá série obsahovala čistý roztok glukózy pro kontrolu (Obr. 21a). K různě koncentrovaným disperzím organovermikulitu na mikrotitrační desce byl přidán pomocí inokulátoru (Obr. 22) 1 µl glukózové suspenze příslušného bakteriálního kmene *E. faecalis* CCM 4224 ( $1,2 \times 10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>), *E. coli* CCM 3954 ( $1,3 \times 10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>), *S. aureus* CCM 3953 ( $1,1 \times 10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>) a *P. aeruginosa* CCM 1960 ( $1,2 \times 10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>), poskytnutých Českou sbírkou mikroorganismů (CCM). Bakteriální suspenze byla po uplynutí 30, 60, 90, 120, 180, 240 a 300 minut a potom během 5 dní vždy v 24 hodinových intervalech přenesena z každé jamky do 100 µl čerstvého glukózního základu. Bakterie byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 a 48 h. Antibakteriální účinnost byla vyhodnocena vzniklým zákalem, který zobrazuje bakteriální růst (Obr. 21b) [102].



**Obr. 21** Stanovení MIC vzorků na mikrotitračních deskách: a) ředění vzorku v glukózním základu (vždy tři jamky obsahují stejný vzorek), b) vzniklý zákal zobrazující bakteriální růst a zároveň antibakteriální účinnost vzorku.



**Obr. 22** Inokulátor.

### 3.2.5.2 Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie (CFU) PE nanokompozitních desek

Při vyjadřování počtu mikroorganismů ve vzorcích se obvykle používá výrazu CFU (*angl.* Colony Forming Units, CFU). V překladu CFU značí "počet jednotek tvořících kolonie". K vyhodnocování výsledků se vždy vybírají jen Petriho misky z těch ředění, kde je množství kolonií dobře počítatelné - kde nejsou kolonie vzájemně přerostlé, slité či jinak nepřehledné. Za nejvhodnější misky k počítání se považují obvykle takové, kde je počet kolonií mezi 30 a 300. Zjištěný počet kolonií se po odečtu průměruje. Množství kolonií nad 500 (Obr. 23) se označuje jako nepočítatelné množství (NM).

Polyetylenové desky s obsahem účinné látky, původních rozměrů 10 x 10 cm (100 cm<sup>2</sup>) byly rozřezány na 4 menší destičky o rozměrech 5 x 5 cm (25 cm<sup>2</sup>). Na jednu stranu destičky byla nanesena suspenze bakteriálního kmene *E. coli* CCM 3954 nebo *S. aureus* CCM

3953 o objemu 25  $\mu\text{l}$ . Stejný postup byl dodržen na kontrolních polyetylenových destičkách bez obsahu účinné látky (kontrola PE). Hustota populace testovacího kmene *E. coli* v 1 ml změřená denzitometrem byla  $2,0 \times 10^5 \text{ cfu.ml}^{-1}$  a  $1,5 \times 10^5 \text{ cfu.ml}^{-1}$  pro *S. aureus*.

Pro zaschnutí suspenze byly destičky umístěny do laminárního boxu a překryty alobalem z důvodu ochrany před světlem a pro udržení mikroklimatických poměrů optimálních k přežívání bakterií v zevním prostředí při teplotě 21 °C.

Po zaschnutí byly za 1 h provedeny první přímé otisky na plotny krevního agaru v Petriho miskách o průměru 9 cm. Destičky byly postupně otiskovány vždy na tři plotny s krevním agarem. Kultivace v termostatu probíhala při  $35 \pm 2$  °C po dobu 24 h. Odečítání výsledků následovalo po 24, 48, 72 a 96 h. Do tabulky byly zaznamenány průměry počtu jednotek tvořících kolonie (CFU) vždy ze 3 otisků. Pokud byl počet CFU v nepočitatelném množství (NM), tj. kolonie na povrchu Petriho misek splývaly, byl výsledek vyjádřen 3 x NM. Taková situace nastala ve všech kontrolách označených PE.



**Obr. 23.** Porovnání počitatelného (vpravo) a nepočitatelného (vlevo) množství vzniklých kolonií.



### 3.3 Antibakteriální účinnost organovermikulitů připravených z iontově-vyměňených vermikulitů

#### 3.3.1 Příprava vzorků

Pro přípravu organovermikulitů byl jako výchozí materiál použit přírodní vermikulit (VER) z ložiska Santa Lucía v Brazílii (Grena, Česká republika), který byl pomlet v kulovém mlýně (Retsch, 20 min, 300 ot./min) a následně frakcionován pod 40 µm.

Následovala iontovýměnná reakce, kdy byl přírodní vermikulit smíchán s 1 M roztokem chloridu sodného nebo chloridu zinečnatého (2 h, 70 °C, míchání), za účelem vzniku monoionní formy Na-vermikulitu (NaVER) či Zn-vermikulitu (ZnVER). Po 2 h byla směs pomocí centrifugace (3000 ot./min, 5 min) odseparována, pevný podíl byl převeden zpět do Erlenmayerovy baňky a znovu byl zahájen proces kationtové výměny s dalším podílem čerstvého roztoku příslušné soli. Tento postup byl opakován 3x. Poté byla usazená část monoionního vermikulitu promývána demineralizovanou vodou, z důvodu odstranění nežádoucích chloridových iontů. Přítomnost těchto iontů byla sledována pomocí speciálního indikačního papírku Quantofix Chloride. Po řádném promytí vzorků, následovalo sušení v horkovzdušné sušárně (70 °C, přes noc). Vysušené vzorky byly označeny NaVER a ZnVER.

Tyto dva vzorky (NaVER a ZnVER) byly společně s přírodním vzorkem vermikulitu (VER) podrobeny interkalaci antibakteriální organickou sloučeninou chlorhexidin diacetátem (CA). V závislosti na kationtové výměnné kapacitě (CEC) původního jílu (106 cmol(+)/kg), byla zvolena koncentrace CA jako 1x násobek CEC, což odpovídalo 1,33 g CA na 2 g VER. Množství odpovídajícího CA bylo vypočteno následovně:

$$106 \text{ cmol}(+)/1\text{kg} = 1060 \text{ mmol}(+)/1000\text{g} = 106 \text{ mmol}(+)/100\text{g}$$

$$106 \text{ meq}/100\text{g} = 106 \text{ mmol}/100\text{g}$$

$$0,106 \text{ mol} \dots\dots\dots 100\text{g vzorku}$$

$$\underline{x \text{ mol} \dots\dots\dots 1\text{g vzorku}}$$

$$x = \frac{0,106 \cdot 1}{100} = 0,00106 \text{ mol}$$

$$1x\text{CEC}: n \cdot M_{\text{CA}} \cdot \text{násobek CEC}$$

$$1x\text{CEC}: 0,00106 \cdot 625,56 \cdot 1 = \underline{0,66 \text{ g CA na } 1\text{g VER}}$$

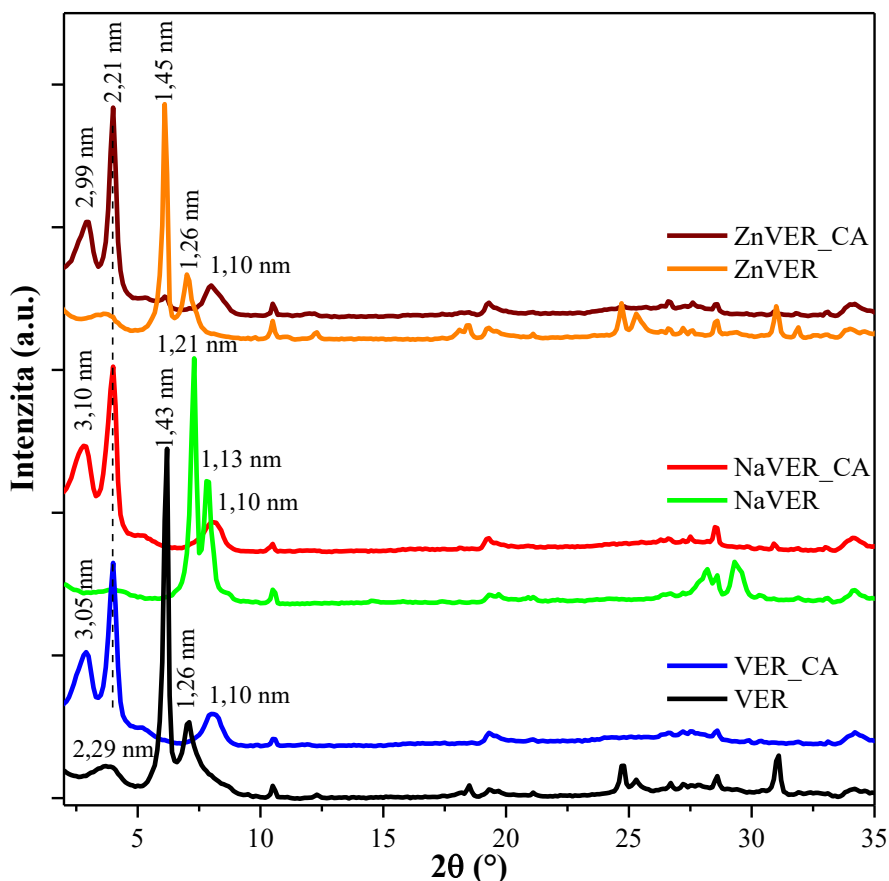
K požadovanému množství VER, NaVER nebo ZnVER bylo přidáno 30 ml demineralizované vody. CA byl rozpuštěn zvlášť v 70 ml etanolu. Oba roztoky se poté slily

dohromady a za neustálého míchání byly zahřívány při 70 °C po dobu 6 h. Po uplynutí této doby byl roztok oddělen centrifugací a pevný podíl byl vysušen při 80 °C. Výsledné organovermikulity byly označeny jako VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA.

### **3.3.2 Charakterizace monoionních vermikulitů a organovermikulitů**

#### **3.3.2.1 Rentgenová (Rtg) difrakční analýza**

Rtg difrakční záznam přírodního VER (Obr. 24) zobrazuje intenzivní bazální difrakci při  $2\theta = 6,2^\circ$  s hodnotou mezivrstevní vzdálenosti  $d(002) = 1,43$  nm. Tato hodnota mezivrstevní vzdálenosti odpovídá hodnotě Mg-vermikulitů s Mg kationty hydratovanými dvěma vrstvami molekul vody [1]. Další bazální difrakce s podstatně nižší intenzitou s mezivrstevní vzdáleností  $d(002) = 1,26$  nm odpovídá vrstevnaté struktuře s jednou vrstvou molekul vody okolo hydratovaných kationtů. Difrakce s hodnotou  $d(002) = 2,29$  nm byla přiřazena superstruktuře, vzniklé interstratifikací jedné vrstvy hydratovaných molekul [103, 104]. Rtg difrakční záznam je charakteristický pro přírodní vermikulity, které vznikají zvětráváním původních trioktaedrických slíd a jsou to vesměs smíšené struktury. Tyto struktury jsou tvořeny směsí na sebe naložených 2:1 vrstev fylosilikátů s různým množstvím molekul vody okolo vyměňených mezivrstevních kationtů s relikty vrstev nepřeměněných původních slíd (bez molekul vody okolo kationtů K, Na v mezivrstevním prostoru s mezivrstevní vzdáleností  $d(001) \pm 1$  nm).



**Obr. 24.** Rtg záznamy přírodního VER, monoionních vermikulitů NaVER, ZnVER a jejich příslušných organovermikulitů VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA.

Rtg záznam kationtově vyměněného vermikulitu ZnVER je téměř totožný se záznamem výchozího VER. Hodnota mezivrstevní vzdálenosti  $d(002)$  se nepatrně zvýšila z hodnoty 1,43 nm u VER na 1,45 nm u ZnVER (Obr. 24). Po kationtové výměně VER u vzorku NaVER je smíšená struktura zachována. Ve vzniklé smíšené struktuře jsou vrstvy, ve kterých došlo k výměně kationtů v mezivrstvi s mezivrstevní vzdáleností 1,43 nm na  $d(002) = 1,21$  nm, která je charakteristická pro NaVER s jednou vrstvou molekul vody okolo  $\text{Na}^+$  kationtů [105, 106] a vrstvy, ve kterých v mezivrstevní vzdálenosti  $d(002) = 1,26$  nm došlo k poklesu mezivrstevní vzdálenosti na  $d = 1,13$  nm s menším množstvím molekul vody.

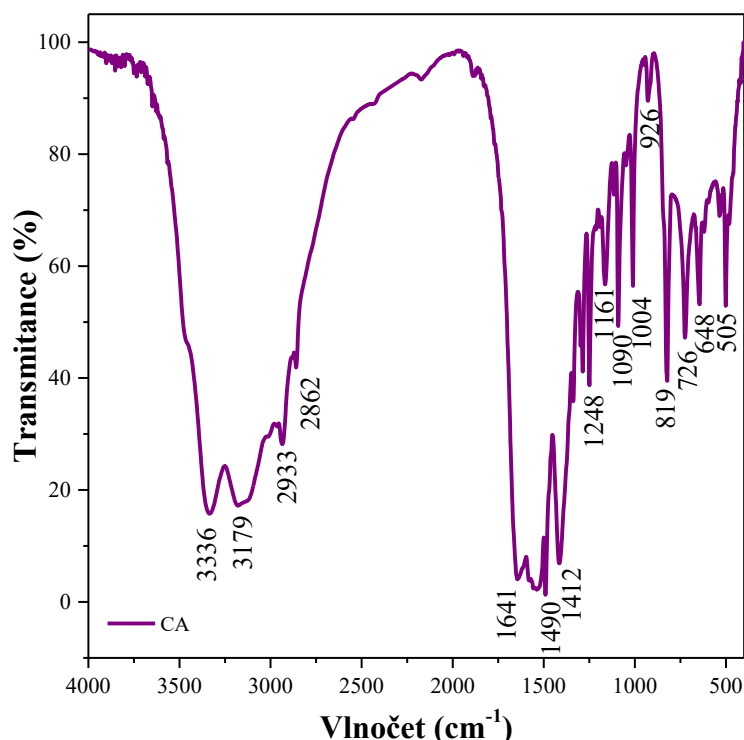
Na Rtg difrakčních záznamech organovermikulitů VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA můžeme pozorovat po interkalaci VER výrazný posun bazálních difrakcí k nižším úhlům  $2\theta$ . Hodnota  $d(002) = 1,43$  nm u VER vzrostla u VER\_CA na  $d = 3,05$  nm. Podobně u ZnVER po interkalaci došlo k expanzi mezivrstevního prostoru a zvětšení hodnoty  $d(002) = 1,45$  nm na  $d = 2,29$  nm a u NaVER z  $d(002) = 1,21$  nm na  $d = 3,10$  nm. Difrakce suprastruktury s hodnotou 2,29 nm pro VER a 2,21 nm u NaVER a ZnVER zůstává u

příslušných organovermikulitů zachována, avšak jejich intenzita vzrůstá. Vznikem těchto nových difrakcí byla potvrzena interkalace CA u všech připravených organojílů.

### 3.3.2.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Infračervená spektra znázorňují vibrační a rotační přechody v molekulách. Pro identifikaci organických sloučenin má velký význam tzv. střední oblast v rozmezí vlnočtů  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ . Oblast vlnočtů, v níž organické látky absorbují infračervené záření, můžeme zhruba rozdělit na dvě části: 1. oblast vibrací valenčních ( $4000 - 2600 \text{ cm}^{-1}$ ), 2. oblast vibrací deformačních ( $1700 - 500 \text{ cm}^{-1}$ ).

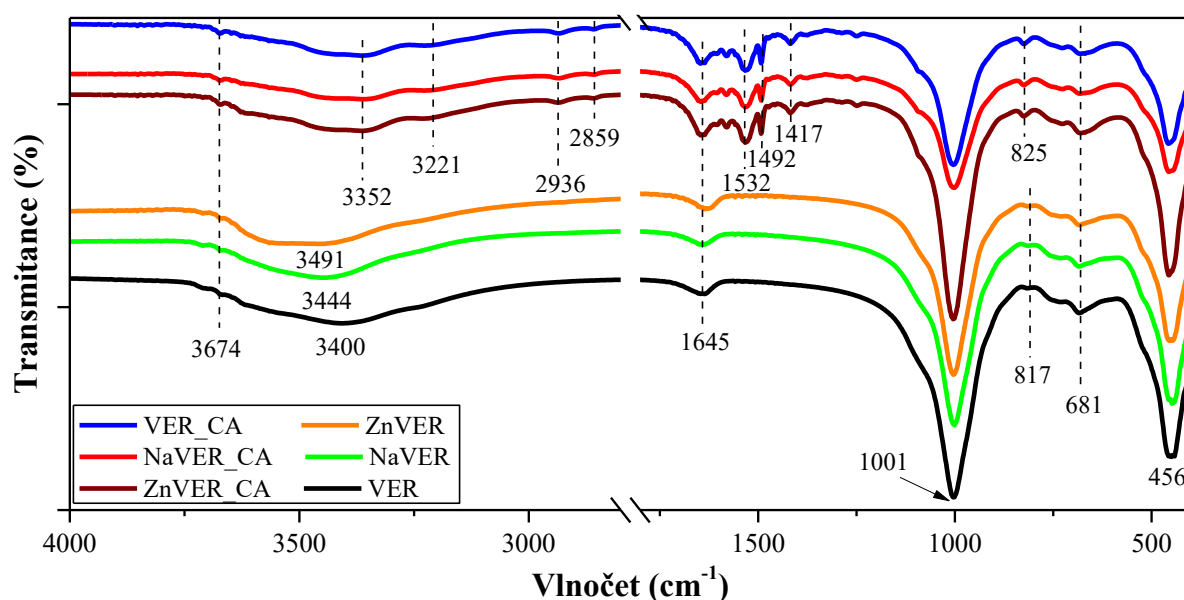
Na následujícím obrázku (Obr. 25) vidíme IČ spektrum čistého chlorhexidin diacetátu. Důležité vibrační skupiny chlorhexidinu jsou asymetrické a symetrické valenční vibrace NH skupin nacházející se v oblasti  $3336$  a  $3179 \text{ cm}^{-1}$ . Dále pak asymetrické a symetrické valenční vibrace C-H vazeb s vlnočty  $2933$  a  $2862 \text{ cm}^{-1}$ . V oblasti  $1641 \text{ cm}^{-1}$  se nacházejí valenční vibrace C=N iminových skupin chlorhexidinu. Deformační vibrace NH skupin sekundárních aminů/iminů se nacházejí v oblasti s vlnočty mezi  $1490$ - $1590 \text{ cm}^{-1}$ . Někdy však tyto vibrace mohou být překryty absorpčním pásem aromatických C=C vazeb v oblasti  $1580 \text{ cm}^{-1}$  [107].



**Obr. 25.** IČ spektrum chlorhexidin diacetátu.

Infračervená spektra VER, NaVER, ZnVER a jejich organovermikulitů VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA jsou zobrazena na následujícím obrázku (Obr. 26). Oblast

v intervalu  $3750 - 2900 \text{ cm}^{-1}$  ve spektrech výchozích jílových minerálů je charakteristická pro valenční vibrace OH skupin, zatímco oblast od  $1300$  do  $500 \text{ cm}^{-1}$  poskytuje informaci o struktuře jílového minerálu a vibrace v této oblasti jsou přiřazeny vibracím v krystalové mřížce [103]. Konkrétně vibrace při  $3674 \text{ cm}^{-1}$  odpovídá jednotce  $\text{Mg}_3\text{OH}$  tvořící oktaedrickou vrstvu a společně s deformačními vibracemi OH skupin v  $681 \text{ cm}^{-1}$ , dokazují trioktaedrický charakter vermikulitu [107]. Široký pás kolem  $3400 \text{ cm}^{-1}$  náleží vibracím vodíkových vazeb s různou silou, pravděpodobně způsobené slabě vázanými molekulami vody [103] a pás při  $1645 \text{ cm}^{-1}$  odpovídá deformačním vibracím adsorbované vody [107]. Poslední intenzivní absorpční pás s hodnotou  $1001 \text{ cm}^{-1}$  je charakteristický pro valenční vibraci Si-O. Deformační vibrace Si-O skupiny jílu se nachází v oblasti  $456 \text{ cm}^{-1}$  [107].



**Obr. 26.** IČ spektra přírodního VER, iontově-vyměněných vermikulitů NaVER, ZnVER a jejich příslušných organovermikulitů VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA.

Jediná viditelná změna v infračervených spektrech iontově-vyměněných vermikulitů je rozšířený absorpční pás v oblasti vlnových délek  $3400 - 3491 \text{ cm}^{-1}$ . Zde se vyskytují valenční vibrace OH skupin adsorbované vody. Posun k vyšším vlnovým délkám nastává z důvodu iontovýmenné reakce, kde dochází k výměně mezivrstevních kationtů za kationty  $\text{Na}^+$  či  $\text{Zn}^{2+}$ .

U spekter organovermikulitů VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA jsou patrné strukturní změny. Tyto změny nastávají v důsledku interkalace CA. Přítomnost této organické látky dokazují symetrické a asymetrické valenční vibrace C-H vazeb aromatického jádra CA v oblasti  $2936$  a  $2859 \text{ cm}^{-1}$ . Absorpční pásy v oblasti vlnových délek  $1492-1532 \text{ cm}^{-1}$  charakterizují deformační vibrace N-H skupin sekundárních aminů/iminů. Může zde rovněž

docházet k překrytí absorpčních pásem aromatických C=C skupin molekuly CA ( $1580\text{ cm}^{-1}$ ). Vlnočty  $3352$  a  $3221\text{ cm}^{-1}$  odpovídají symetrickým a asymetrickým vibracím N-H skupin CA. V této oblasti ( $3383\text{--}3336\text{ cm}^{-1}$ ) se rovněž nacházejí strukturní OH vazby jílu. Nápadné rozšíření absorpčního pásu v této oblasti je z důvodu vzniku intermolekulární vodíkové vazby mezi OH vazbami na povrchu vermikulitu a NH vazbami CA [107]. Posun deformační vibrace z  $817$  na  $825\text{ cm}^{-1}$  nasvědčuje interakci NH center CA s oktaedrem Al-O-H vermikulitu [90].

### 3.3.3 Vyhodnocení antibakteriální účinnosti monoionních vermikulitů a z nich připravených organovermikulitů

U vzorků přírodního VER, iontově-vyměněných vermikulitů NaVER, ZnVER a jejich příslušných organovermikulitů VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA byla určena antibakteriální účinnost na základě stanovení minimální inhibiční koncentrace. K testování byly použity čtyři klinicky významné bakteriální kmeny: *E. faecalis* ( $G^+$ ), *S. aureus* ( $G^+$ ), *E. coli* ( $G^-$ ) a *P. aeruginosa* ( $G^-$ ). Odečty probíhaly v časových intervalech 30 min, 120 min, 240 min, 24 h a 5 dní. Výsledky MIC, jenž je potřebná k inhibici bakteriálního růstu, jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 4). Pokles MIC vzorků organovermikulitů je přehledně zpracován v následujícím grafu (Obr. 27).

**Tab. 4.** MIC (% m/V) přírodního VER, iontově-vyměněných vermikulitů NaVER, ZnVER a jejich příslušných organovermikulitů VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA.

Vzorek	<i>E. faecalis</i> MIC (% m/V)					<i>S. aureus</i> MIC (% m/V)				
	30 min	120 min	240 min	24 h	5 d	30 min	120 min	240 min	24 h	5 d
<b>VER</b>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<b>NaVER</b>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<b>ZnVER</b>	> 10	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	> 10	3,33	0,37
<b>VER_CA</b>	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014
<b>NaVER_CA</b>	>10	10	3,33	0,014	0,014	1,11	1,11	1,11	0,014	0,014
<b>ZnVER_CA</b>	3,33	10	10	10	0,041	1,11	1,11	1,11	0,014	0,014

Vzorek	<i>E. coli</i> MIC (% m/V)					<i>P. aeruginosa</i> MIC (% m/V)				
	30 min	120 min	240 min	24 h	5 d	30 min	120 min	240 min	24 h	5 d
<b>VER</b>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<b>NaVER</b>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<b>ZnVER</b>	> 10	> 10	> 10	10	0,37	> 10	> 10	> 10	10	10
<b>VER_CA</b>	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014	>10	>10	10	10	10
<b>NaVER_CA</b>	1,11	1,11	1,11	0,014	0,014	10	10	10	10	10
<b>ZnVER_CA</b>	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014	10	10	10	10	10

Z výsledků antibakteriálních testů je zřejmé, že vzorky přírodního VER a vermikulitů po iontovýmenné reakci NaVER a ZnVER nevykazují žádnou antibakteriální aktivitu. Pouze u ZnVER došlo po delší době působení (24 h) na bakteriální kmen *S. aureus* a *E. coli* k mírnému snížení hodnot MIC. To je pravděpodobně způsobeno přítomností  $\text{Zn}^{2+}$  iontů v mezivrstevním prostoru, jež mají samy o sobě mírný antibakteriální účinek [108].

Všechny vzorky organovermikulitů obsahující interkalovaný CA vykazují mnohem výraznější antibakteriální účinnost. Velmi efektivně se jeví vzorek NaVER\_CA, který působí již po 30 min vůči bakteriím *S. aureus* a *E. coli*. U gram-pozitivní bakterie *E. faecalis* nastává snížení bakteriálního růstu až po 240 min působení. Po 24 h působení pak u všech uvedených bakterií dochází k poklesu bakteriálního růstu a MIC potřebná k inhibici je velmi nízká. Vzorek NaVER\_CA se zdá být velmi univerzálním antibakteriálním organojílem, jelikož vykazuje antibakteriální účinky vůči všem výše uvedeným bakteriálním kmenům, aniž by rozlišoval, zda se jedná o gram-pozitivní nebo gram-negativní bakterie.

Druhý vzorek VER\_CA neměl tak rychlý nástup antibakteriálního účinku jako vzorek NaVER\_CA. Jeho antibakteriální efekt byl stejný vůči *E. faecalis*, *S. aureus* i *E. coli*, s tím, že k výraznému poklesu MIC došlo po 24 h působení, přičemž tato koncentrace je velmi nízká. Z hlediska dlouhodobého antibakteriálního účinku připravených organojílů se tedy do popředí dostávají dva připravené organojíly NaVER\_CA a VER\_CA.

Poslední organovermikulit ZnVER\_CA vykázal nejvyšší antibakteriální účinnost proti gram-pozitivnímu bakteriálnímu kmeni *S. aureus*, kdy se antibakteriální efekt projevil již po 30 min působení. Vůči gram-negativní bakterii *E. coli* nebylo snížení tak markantní jako u *S. aureus* a výrazný pokles bakteriálního růstu nastal až po 24 h expozice. V případě *E. faecalis* je zapotřebí velmi dlouhé expozice (5 dní) pro dosažení vysoké antibakteriální účinnosti.

Zcela neaktivně působila gram-negativní *P. aeruginosa*, vůči které nepůsobil žádný z připravených organovermikulitů. Nedošlo zde k žádnému snížení bakteriálního růstu.

### 3.3.4 Diskuze

Tato studie se zabývala vlivem iontovýmenné reakce výchozího jílového minerálu VER na výslednou antibakteriální účinnost připravených organojílů. Rtg difrakční analýzy dokládají vznik interkalovaných smíšených monoionních forem NaVER a ZnVER (Obr. 24). Vznik větší/menší expanze mezivrstevní vzdálenosti po interkalaci je důsledkem různé velikosti vyměňovaných iontů, které se v prostorech mezivrství během iontovýmenné reakce vyskytují [12]. Interkalace chlorhexidinu do mezivrství monoionních vermikulitů byla potvrzena výrazným posunem hlavních bazálních difrakcí směrem k nižším úhlům a nárůstem mezivrstevní vzdálenosti všech organojílů.

Přítomnost chlorhexidinu v připravených organovermikulitech byla rovněž potvrzena pomocí infračervené spektrometrie. Na základě charakterizačních technik Rtg a IČ lze potvrdit úspěšnou přípravu všech zmiňovaných organovermikulitů VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA.

Všechny připravené materiály byly testovány vůči 4 bakteriálním kmenům za účelem stanovení jejich antibakteriální účinnosti. Dle očekávání samotné monoionní formy vermikulitu VER, NaVER a ZnVER neměly v podstatě žádnou antibakteriální aktivitu ani po 5 dnech expozice.

Připravené organovermikulity vykazaly antibakteriální účinnost (Obr. 27). Každý z připravených vzorků působí vůči testovaným bakteriálním kmenům zcela individuálně. NaVER\_CA lze označit jako univerzální antibakteriální organojíl, protože jeho antibakteriální účinky nerozlišují mezi gram-pozitivní a gram-negativní bakterií. Nejlepší antibakteriální efekt se projevil vůči bakteriálnímu kmeni *S. aureus* a *E. coli*, kdy došlo k inhibici bakteriálního růstu již po 30 min působení (Obr. 27a). Po 24 h a více hodinách se začíná projevovat účinnost vůči gram-pozitivnímu kmeni *E. faecalis*, přičemž právě gram-pozitivní bakterie jsou z dlouhodobého měřítka mírně odolnější.

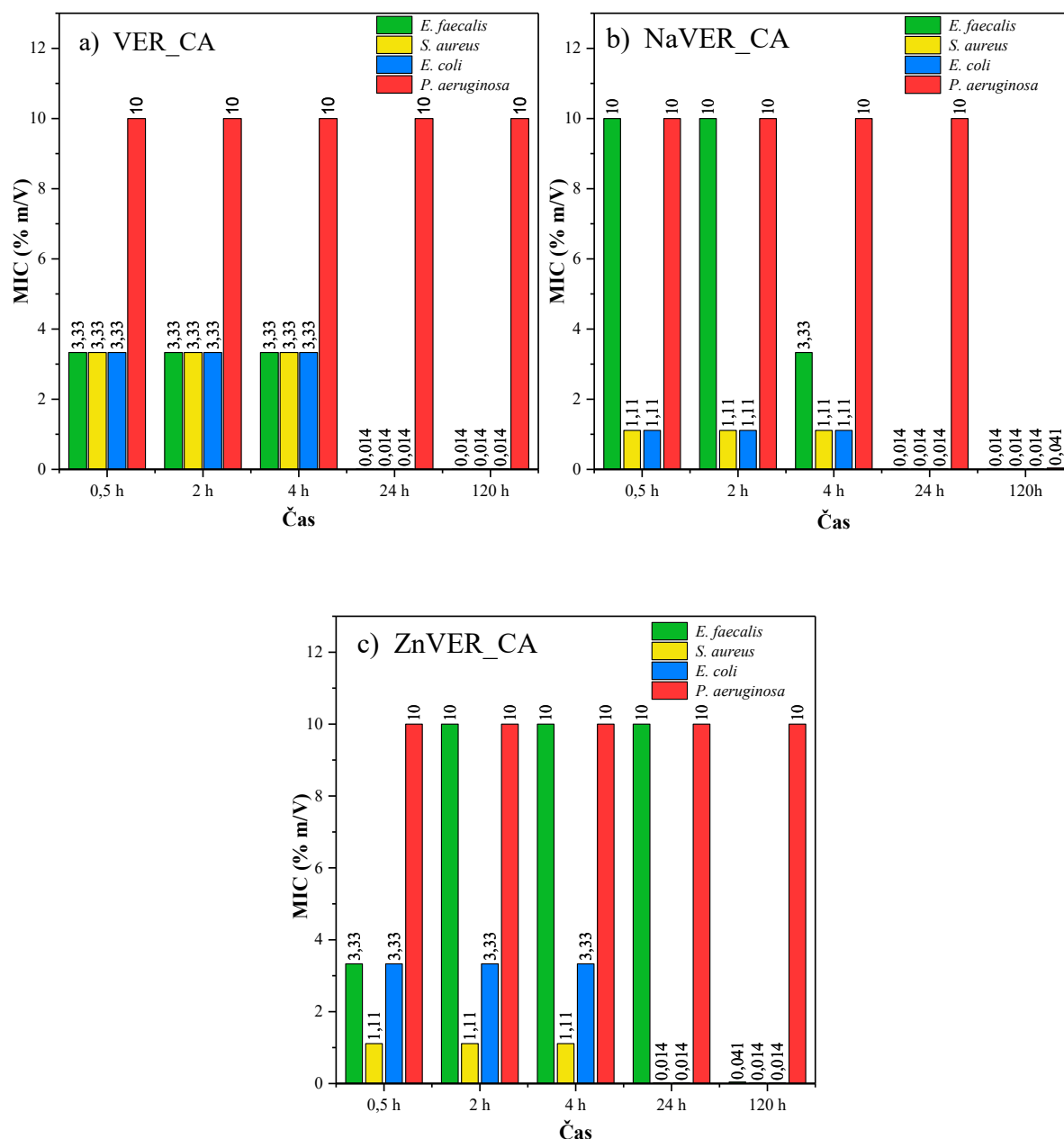
Vzorek VER\_CA neměl tak rychlý nástup antibakteriálního účinku jako NaVER\_CA. Jeho účinnost byla stejná vůči všem třem výše uvedeným kmenům. Výrazný pokles MIC nastal po 24 h působení. (Obr. 27b).

Vzorek ZnVER\_CA projevil různou antibakteriální aktivitu. Nejlépe působil proti gram-pozitivnímu *S. aureus* a to již po 30 min, u *E. coli* nastal účinek až po 24 h působení vzorku a u *E. faecalis* nastal efekt až při dlouhodobém působení (5 dní).

Ani jeden z připravených organovermikulitů neprojevil antibakteriální účinnost proti gram-negativní *P. aeruginosa*. Vysoká odolnost této bakterie může být připisována rezistenci



její vnější membrány. Vnější membrána představuje pro příjem léčivých přípravků jakousi polopropustnou membránu. Jelikož se příjem malých hydrofilních molekul odehrává pouze na malé části této vnější membrány (protein porin obklopuje otvůrky ve vnější membráně), představuje tato membrána limitující faktor pro prostup látek (např. chlorhexidinu) do bakteriální buňky. Toto platí pro všechny gram-negativní bakterie, avšak především pro *P. aeruginosa*, která má celkově propustnost vnější membrány 12-100 krát nižší než *E. coli* [82].



**Obr. 27.** Porovnání antibakteriální účinnosti vzorků a) VER\_CA, b) NaVER\_CA a c) ZnVER\_CA vůči jednotlivým bakteriálním kmenům v závislosti na době působení.

Nejlepších výsledků dosáhl vzorek NaVER\_CA, který již po 30 min působil proti *S. aureus* (G<sup>+</sup>) i *E. coli* (G<sup>-</sup>). Spolu se vzorkem VER\_CA potom vykazovaly dlouhodobý antibakteriální efekt (po 24 h působení). Z výsledků této studie vyplývá, že iontovýměnná reakce výchozích vermikulitů má smysl v případě, že požadujeme výsledný vzorek s rychlým nástupem účinku. Pokud nás zajímají dlouhodobé účinky, pak iontovýměnná reakce není nutná, jelikož antibakteriální aktivita z dlouhodobého hlediska byla vůči *E. faecalis*, *S. aureus* i *E. coli* byla naprosto stejná, s velmi nízkou MIC potřebnou k zastavení bakteriálního růstu.

### **3.4 Vliv mechanické a chemické úpravy vermikulitu na výslednou antibakteriální účinnost připravených organovermikulitů**

#### **3.4.1 Příprava vzorků**

Přírodní vermikulit byl pomlet v kulovém mlýnu (Retsch, 20 min, 300 ot./min) a následným síťováním byla získána frakce < 40 µm (vzorek označen VER). Polovina této frakce byla dále pomleta v tryskovém mlýnu (Sturtevant, ~ 1,5 g/min, poměr podávacího a mlecího tlaku 70/50 PSI). Tento vzorek byl označen VERj.

Následně byly tyto vermikulity podrobeny působení v 1 M HCl (5 h, 80 °C, míchání). Po zchladnutí byly vzorky promývány demineralizovanou vodou až do vymizení reakce na chloridy. Obsah chloridů byl stanoven semikvantitativně pomocí indikačních papírků Quantofix Chloride. Takto aktivované vermikulity (označené VERa a VERja) byly sušeny přes noc při 80 °C.

Vzorky mechanicky (VER a VERj) a chemicky (VERa a VERja) upraveného vermikulitu byly podrobeny interkalaci s CA v koncentraci 1 x CEC, za vzniku organovermikulitů. Reakce probíhala v etanolickém prostředí při 75 °C po dobu 6 h. Po odstředění (3500 ot./min, 5 min) byly organovermikulity vysušeny přes noc při 80 °C a označeny jako VER\_CA, VERj\_CA, VERa\_CA a VERja\_CA.

Struktura a vazebné interakce byly charakterizovány pomocí rentgenové práškové difrakce a infračervené spektrometrie. Morfologie povrchů upravených vermikulitů byla analyzována skenovací elektronovou mikroskopií a rovněž byla stanovena výsledná antibakteriální účinnost.

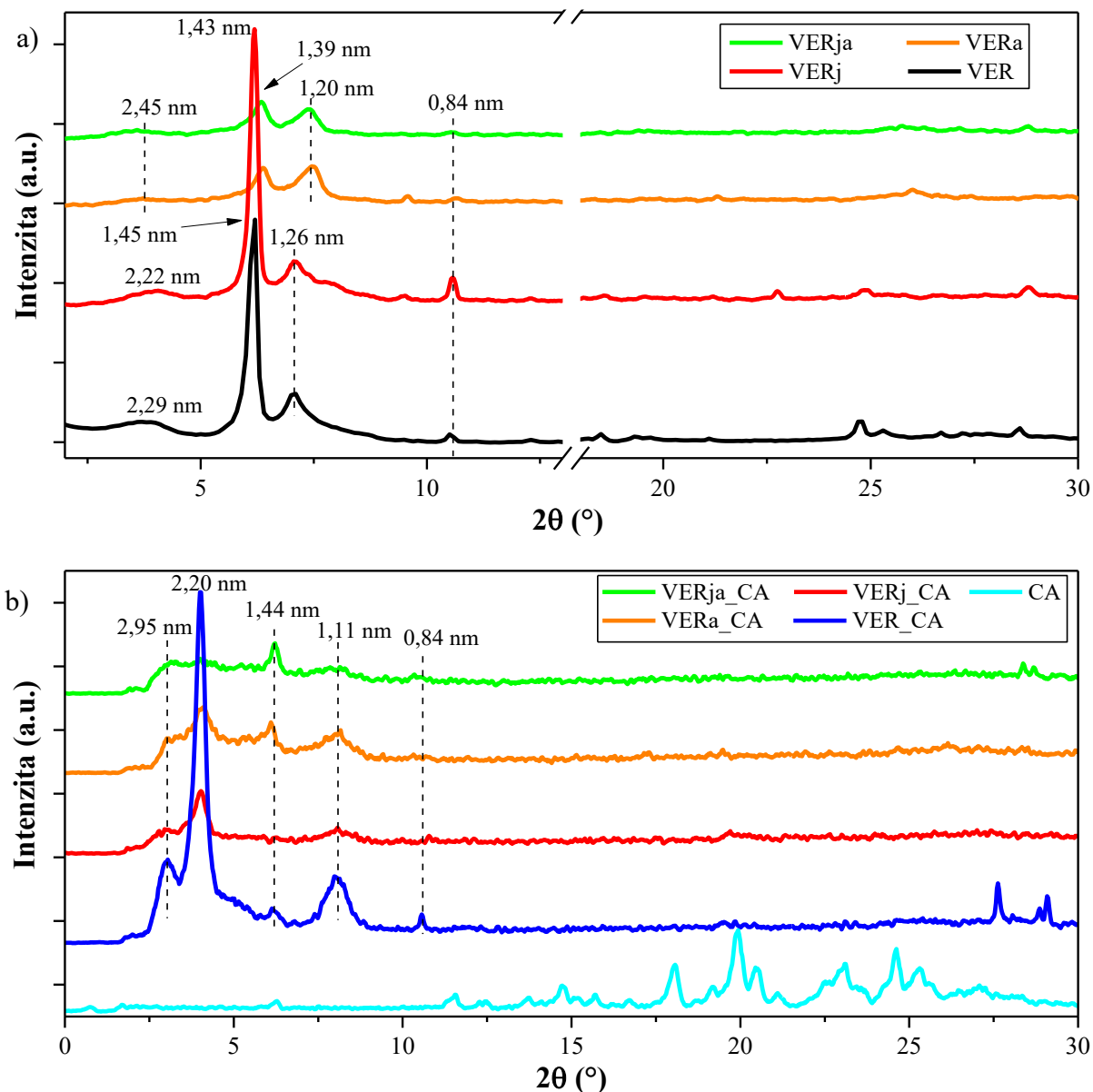
### 3.4.2 Charakterizace mechanicky a chemicky modifikovaných vermikulitů a organovermikulitů

#### 3.4.2.1 Rentgenová prášková difrakce

Rtg difrakční záznamy mletých a kyselinou upravených vermikulitů a z nich následně připravených organovermikulitů jsou zobrazeny na následujících obrázcích (Obr. 28 a, b). Vzorek VER, mletý v kulovém mlýně, vykazuje bazální difrakce typické pro přírodní vermikulit (Obr. 28a), jehož charakterizace je uvedena v kap. 3.3.2.1.

Následná mechanická úprava přírodního vermikulitu v tryskovém mlýnu vedla k nárůstu intenzity bazální difrakce 002 s mezivrstevní vzdáleností  $d(002) = 1,43$  nm což naznačuje o přítomnosti krystalických domén difraktujících ve směru kolmém na bazální roviny (Obr. 28a) [109]. Difrakce s hodnotou  $d = 0,84$  nm byla v literatuře přiřazena směsím bobtnajících a nebobtnajících forem [110].

Po acidifikaci vzorků VER a VERj 1M kyselinou chlorovodíkovou došlo k porušení kladu na sebe naložených vrstev a jejich exfoliaci, což se projevilo poklesem intenzity bazální difrakce a rozšířeným profilem (Obr. 28a) [16, 103, 111]. Vzorky vermikulitů VERa a VERja vykázaly výrazně nižší intenzitu hlavních bazálních reflexí vermikulitu, které nasvědčují o úbytku na sebe naložených vrstev ve směru osy *c*. Mírný pokles mezirovinné vzdálenosti na  $d(002) = 1,39$  nm může odpovídat reorganizaci uložení mezivrstevního materiálu (molekul vody a kationtů).



**Obr. 28.** Rtg difrakční záznamy a) vermikulitů po kulovém a tryskovém mletí a acidifikovaných vermikulitů, b) z nich připravených organovermikulitů.

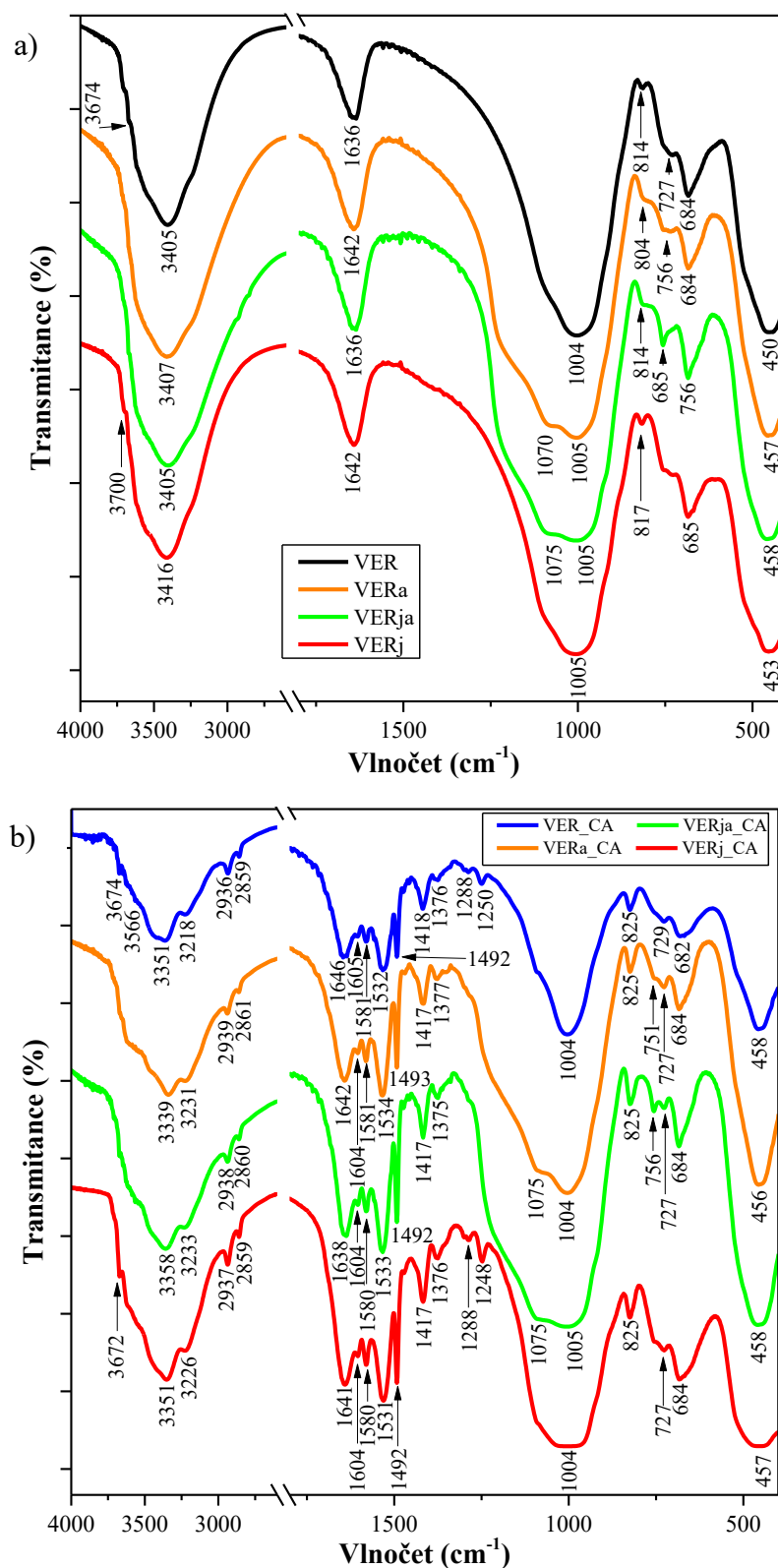
Rtg difrakční záznamy vzorků po interkalaci chlorhexidinu jsou uvedeny na Obr. 28b. V případě základního vermikulitu VER\_CA, je interkalace potvrzena vznikem nových reflexí, které odpovídají fázi VER interkalovaného CA s hodnotami mezivrstevních vzdáleností  $d(001) = 2,95$  nm  $d(001) = 2,20$  nm a  $d(002) = 1,11$  nm. Bazální difrakce původního a neinterkalovaného vermikulitu s hodnotou  $d(002) = 1,44$  nm jsou velmi málo intenzivní a po tryskovém mletí se na difrakčním záznamu nevyskytovaly. Interkalaci chlorhexidinu do vermikulitu připraveného mletím v tryskovém mlýnu (VERj\_CA) lze sledovat velmi výrazné změny v porovnání s VER\_CA. Nejen, že není pozorovatelná hlavní bazální difrakce původního vermikulitu s mezivrstevní hodnotou  $d(002) = 1,43$  nm, která byla před interkalací

u vzorku VERj velmi intenzivní, ale rovněž nově vzniklé reflexe odpovídající interkalovanému chlorhexidinu jsou velmi málo intenzivní. Tyto výrazné změny potvrzují exfoliaci struktury vermikulitu.

U acidifikovaných vzorků vermikulitu VERa\_CA a VERja\_CA byla interkalace CA omezena. Kyselinové loužení způsobilo porušení vazeb mezi silikátovými vrstvami následkem uvolnění mezivrstevních kationtů. Srovnáme-li Rtg difrakční záznamy vzorků VER\_CA, VERj\_CA, VERa\_CA a VERja\_CA se záznamem čistého CA, můžeme pozorovat i přes malá množství CA použitého k interkalaci, přítomnost volného CA v těchto vzorcích.

#### **3.4.2.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací**

Infračervená spektra přírodního vermikulitu (VER) a z něj připraveného organovermikulitu (VER\_CA) jsou znázorněny na Obr. 29. Absorpční pás ve spektru přírodního vermikulitu (Obr. 29a) v oblasti valenčních vibrací OH skupin s vlnočtem  $3674\text{ cm}^{-1}$  náleží jednotce  $\text{Mg}_3\text{OH}$ , který spolu s deformačními vibracemi OH skupin v  $684\text{ cm}^{-1}$  naznačuje, že má tento vermikulit trioktaedrický charakter [112]. Další pás v oblasti valenčních vibrací OH skupin s vlnočtem  $3405\text{ cm}^{-1}$  náleží OH skupinám adsorbované vody. Přítomnost mezivrstevní vody naznačuje charakteristická deformační OH vibrace s vlnočtem v  $1636\text{ cm}^{-1}$ . Intenzivní absorpční pás s vlnočtem  $1004\text{ cm}^{-1}$  náleží Si-O valenčním vibracím spolu s vlnočtem  $450\text{ cm}^{-1}$ , jenž naznačuje Si-O vibrace deformační [113].



**Obr. 29.** IČ spektra a) mechanicky a chemicky upravených vermikulitů a b) z nich připravených organovermikulitů.

Infračervené spektrum vzorku VER\_CA (Obr. 29b) obsahuje nové absorpční pásy s vlnočty  $3351\text{ cm}^{-1}$  a  $3218\text{ cm}^{-1}$ , které náleží asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím

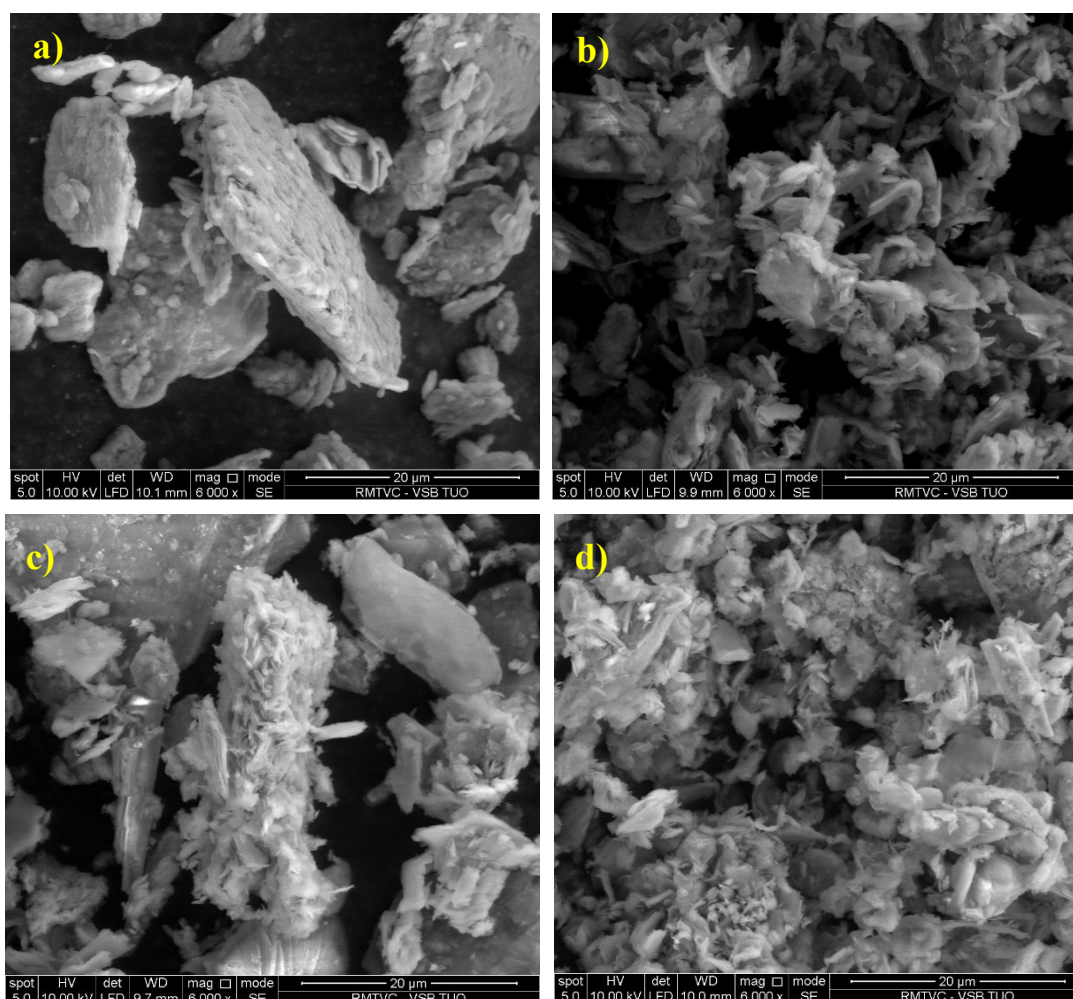
N-H skupin chlorhexidinu. Vibrace v  $2936\text{ cm}^{-1}$  a  $2859\text{ cm}^{-1}$  odpovídají asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím C-H vazeb chlorhexidinu. V oblasti valenčních vibrací OH skupin se nachází absorpční pás s vlnočtem  $3566\text{ cm}^{-1}$ , který náleží jednotce  $\text{Fe}_2\text{OH}$ . Přítomnost tohoto pásu naznačuje, že ačkoli je vermikulit nominálně trioktaedrický, některé OH skupiny jsou propojeny s vakancemi a nachází se v dioktaedrickém uspořádání [112]. Valenční vibrace C=N iminových skupin odpovídá pásu s vlnočtem  $1646\text{ cm}^{-1}$ . Pásky vyskytující se v intervalu  $1590\text{--}1490\text{ cm}^{-1}$  představují deformační vibrace NH skupin sekundárních aminů a/nebo iminů. Tyto vibrace však mohou být překryty absorpčním pásem aromatických C=C skupin s vlnočtem  $1580\text{ cm}^{-1}$  [114, 115].

Infračervená spektra tryskově mletého vermikulitu (VERj) a kyselinou aktivovaných vermikulitů (VERja, VERa) jsou znázorněna na Obr. 29a. Nejvýznamnější spektrální změna je viditelná v oblasti okolo  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Intenzivní absorpční pás ve spektru vzorku VERj s vlnočtem  $1005\text{ cm}^{-1}$ , náleží Si-O valenčním vibracím, stejně tak, jako v případě VER (Obr. 29a). U vzorků po aktivaci kyselinou (VERja a VERa) se tento pás mírně rozšiřuje a objevuje se nová valenční vibrace s vlnočtem okolo  $1070\text{ cm}^{-1}$  odpovídající Si-O vazbě amorfní siliky [116].

IČ spektra připravených organovermikulitů (VERj\_CA, VERja\_CA, VERa\_CA) jsou zobrazena na Obr. 29b. U vzorků organovermikulitů nedochází, kromě výše uvedeného rozšíření absorpčního pásu, k žádným dalším výrazným změnám. Je zde opět potvrzena přítomnost chlorhexidinu, podobně jako u VER\_CA (Obr. 29b).

### 3.4.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Snímky mechanicky (VER, VERj) a chemicky (VERa, VERja) aktivovaných vermikulitů jsou zobrazeny na Obr. 30. Morfologie přírodního vermikulitu VER je charakteristická vrstevnatou strukturou. Na Obr. 30a vidíme jednotlivé šupinky vermikulitu s hladkým povrchem. Při tryskovém mletí (Obr. 30b) dochází ke zmenšení částic, pozorujeme svinutí šupin a roztřepení jejich okrajů, čímž vzniká větší reakční specifický povrch. Při porovnání snímků zachycujících morfologii vermikulitu po působení kyseliny (Obr. 30c, d) vidíme patrné změny oproti původním vzorkům (Obr. 30a, b). Na povrchu jednotlivých vermikulitových destičkovitých částic se tvoří drobné agregáty, které naznačují jejich narušení.



**Obr. 30.** Snímky SEM vermikulitu a) kulově mletého (VER), b) tryskově mletého (VERj), c) kulově mletého po aktivaci kyselinou (VERa) a d) tryskově mletého po aktivaci kyselinou (VERja).

### 3.4.3 Vyhodnocení antibakteriální účinnosti mechanický a chemicky modifikovaných vermikulitů a z nich připravených organovermikulitů

Antibakteriální účinnost organovermikulitů byla stanovena na vybraných gram-pozitivních (*S. aureus*, *E. faecalis*) a gram-negativních (*E. coli*, *P. aeruginosa*) bakteriálních kmenech v časových intervalech 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, a po dnech (d): 1 d, 2 d, 3 d, 4 d a 5 d. Vybrané minimální inhibiční koncentrace, potřebné k usmrcení bakterií jsou shrnuty v Tab. 5.



**Tab. 5.** MIC (% m/V) připravených organovermikulitů.

Vzorek	<i>S. aureus</i> MIC (% m/V)					<i>E. faecalis</i> MIC (% m/V)				
	30 min	120 min	240 min	1 d	5 d	30 min	120 min	240 min	1 d	5 d
VER_CA	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014
VERj_CA	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014	1,11	0,37	0,37	0,014	0,014
VERa_CA	10	3,33	3,33	0,014	0,014	1,11	1,11	1,11	0,014	0,014
VERja_CA	10	3,33	3,33	0,014	0,014	1,11	1,11	1,11	0,014	0,014
Vzorek	<i>E. coli</i> MIC (% m/V)					<i>P. aeruginosa</i> MIC (% m/V)				
	30 min	120 min	240 min	1 d	5 d	30 min	120 min	240 min	1 d	5 d
VER_CA	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014	> 10	>10	10	10	10
VERj_CA	1,11	1,11	1,11	0,014	0,014	>10	10	3,33	10	10
VERa_CA	3,33	1,11	1,11	0,014	0,014	10	10	10	1,11	1,11
VERja_CA	3,33	1,11	1,11	0,014	0,014	3,33	3,33	1,11	0,37	0,37

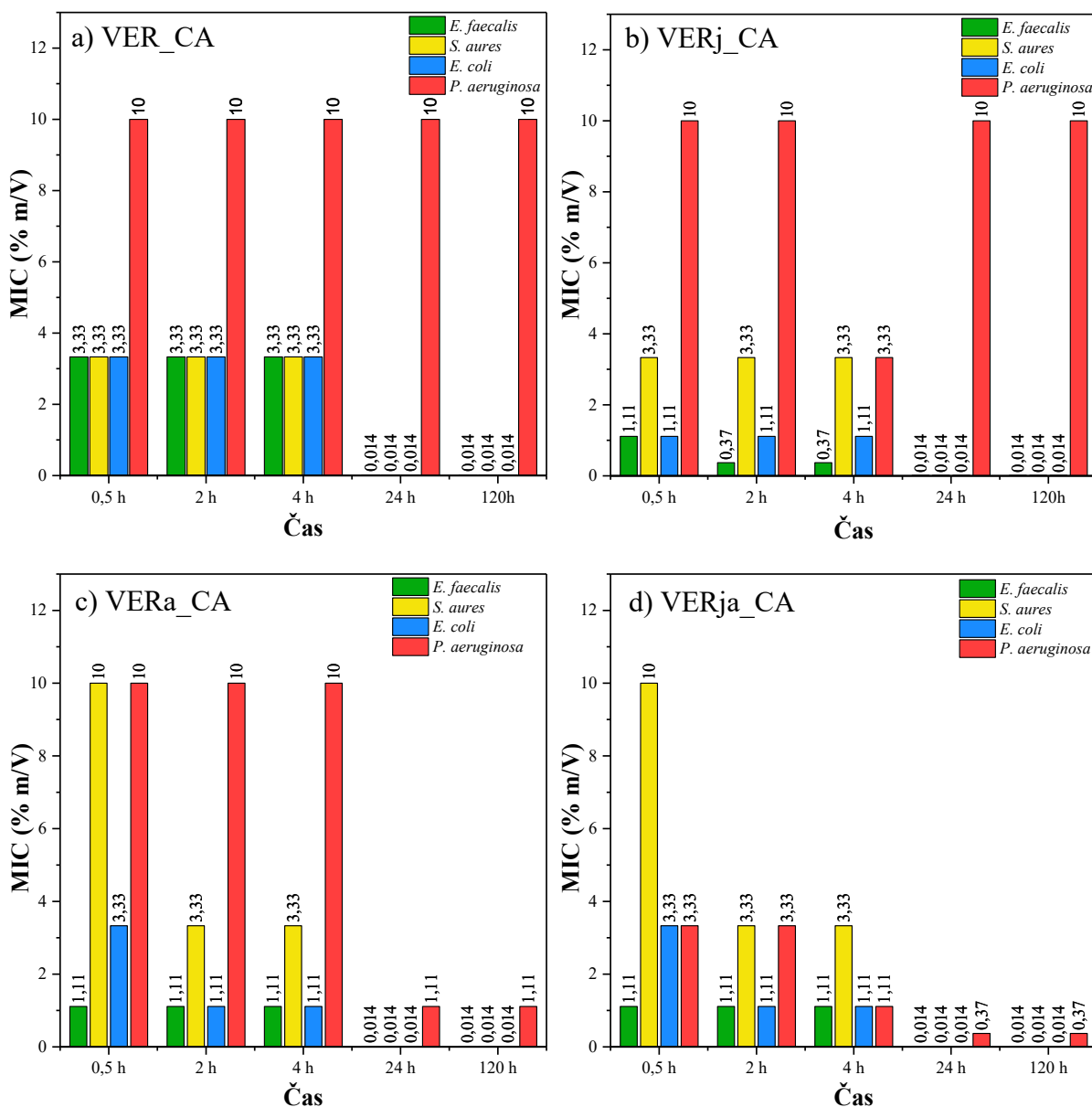
Všechny připravené organovermikulity vykázaly antibakteriální účinnost vůči všem 4 modelovým druhům bakterií a to především v časech 24 h a delších, kdy bylo, s výjimkou kmene *P. aeruginosa*, dosaženo nejnižších měřených hodnot MIC. Tryskově mletý VERj\_CA prokázal v počátečních časech odečtů nižší MIC potřebnou k usmrcení bakterií *E. faecalis* a *E. coli*, než vzorek VER\_CA. Vliv acidifikace se projevil především u kmene *P. aeruginosa*, kdy u vzorku VERja\_CA došlo k poklesu MIC již po 30 min. Z dlouhodobého hlediska byla aktivita všech připravených vzorků velmi dobrá a bakteriální růst byl téměř zastaven. Toto zjištění je velice důležité z hlediska využitelnosti připravených vzorků.

### 3.4.4 Diskuze

Druhá studie se zabývala vlivem mechanické a chemické modifikace přírodního vermikulitu a následné antibakteriální účinnosti organovermikulitů získaných po úpravě. Z výsledků Rtg analýzy je patrné, že úprava tryskovým mletím má minimální vliv na strukturu vermikulitu. Toto nasvědčuje, že zvolený čas mletí tryskovým mlýnem je dostatečně krátký, aby nedošlo k amorfizaci a shluku částic do větších agregátů [14, 16]. Amorfizace a agregace částic je nežádoucí jev, který vede ke snížení specifického povrchu. Na druhou stranu loužení vermikulitů v kyselině vedlo k výraznému poklesu bazálních difrakcí a k mírnému zmenšení mezivrstevních vzdáleností. Snížení intenzity bazálních difrakcí naznačuje větší podíl amorfní fáze, což potvrzuje vznik nové valenční vibrace s vlnočtem  $1070\text{ cm}^{-1}$ , která odpovídá vazbě Si-O amorfni siliky [116]. Přítomnost amorfni siliky jasně naznačuje, že loužení kyselinou

narušuje přímo tetraedrické vrstvy [33]. Můžeme tedy předpokládat, že u takto modifikovaných vzorků je větší množství CA vázáno na povrchu vermikulitu.

Všechny připravené organovermikulity byly testovány vůči 4 bakteriálním kmenům pro vyhodnocení jejich antibakteriální účinnosti. Vzorky vykázaly výrazné dlouhodobé antibakteriální účinky po 24 h expozice (Obr. 31).



**Obr. 31** Porovnání antibakteriální účinnosti a) VER\_CA, b) VERj\_CA, c) VERa\_CA a d) VERja\_CA vůči jednotlivým bakteriálním kmenům v závislosti na době působení.

Při srovnání antibakteriální účinnosti mechanicky (kulový mlýn, tryskový mlýn) modifikovaných organovermikulitů (VER\_CA a VERj\_CA) vidíme, že mechanická modifikace povrchu tryskovým mletím měla pozitivní vliv na inhibici růstu bakterií *E. faecalis*

a *E. coli*. Tento nárůst antibakteriální aktivity je přisuzován výrazně většímu specifickému povrchu, který vzniká po tryskovém mletí. S výjimkou kmene *P. aeruginosa*, vykazovaly všechny vzorky velmi dobrý a dlouhodobý účinek.

Organovermikulity připravené z materiálů modifikovaných jak mechanicky, tak chemicky (VERa\_CA a VERja\_CA) měly horší antibakteriální účinek na *S. aureus* v krátké době expozice (0,5 h), než pouze mechanicky upravené vzorky VER\_CA a VERj\_CA. Vzorky po acidifikaci VERa\_CA a VERja\_CA však celkově prokázaly mnohem lepší antibakteriální účinnost vůči kmenu *P. aeruginosa*. Zejména vzorek VERja\_CA pak prokázal, že struktura vermikulitu narušená vlivem tryskového mletí, podpořena acidifikací vede k dobrému působení na velice odolnou bakterii.

Závěrem lze tedy shrnout, že mechanické a chemické úpravy vermikulitu mají podstatný vliv na výslednou antibakteriální účinnost připravených organovermikulitů. Mechanická úprava výchozího vermikulitu vede ke zmenšení velikosti částic a k nárůstu specifického povrchu. Toto zvětšení povrchu má za následek vyšší antibakteriální účinnost organovermikulitu, a to již po krátké době expozice (0,5 – 4 h). Chemická modifikace vermikulitů loužením kyselinou chlorovodíkovou má za následek částečnou amorfizaci vermikulitu, ale rovněž vzniká porézní struktura, která má velmi vysoký specifický povrch. Organovermikulity modifikované kyselinou chlorovodíkovou vykazaly velmi vysokou antibakteriální aktivitu vůči velmi odolné bakterii *P. aeruginosa*, čehož lze využít při praktickém využití těchto vzorků.

### **3.5 Stabilita antibakteriálního nanokompozitu chlorhexidin/vermikulit**

#### **3.5.1 Příprava vzorků**

Pro přípravu nanokompozitu chlorhexidin/vermikulit byl jako vstupní materiál opět použit přírodní vermikulit (VER) pomletý v kulovém mlýnu (Retsch, 20 min, 300 ot./min), který byl následně síťován na frakci < 40 µm a chlorhexidin diacetát (CA) o koncentraci odpovídající 1 x CEC. Etanolický roztok chlorhexidinu byl smíchán s vodným roztokem vermikulitu a tato směs byla za neustálého míchání zahřívána na 75 °C po dobu 6h. Po odstředění (3500 ot./min, 5 min) byl nanokompozit vysušen při 80 °C přes noc a označen jako VER\_CA.

Proces uvolňování CA z matrice VER byl simulován mícháním vzorku VER\_CA ve vodném prostředí, kdy pH bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 2 a 7. Vzorky byly míchány při laboratorní teplotě ~ 20 °C (vzorek s označením L) a při zvýšené

teplotě  $\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 h. Po odstředění byly vzorky vysušeny při  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  přes noc. Označení vzorků uvádí Tab. 6.

**Tab. 6.** Označení vzorků chlorhexidin/vermikulitu po procesu uvolňování.

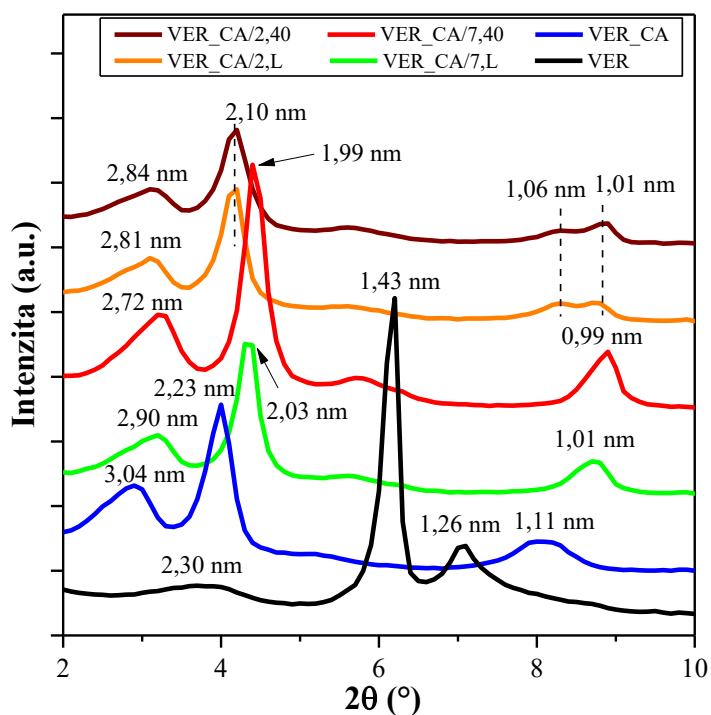
Označení vzorku	Podmínky procesu uvolňování
VER_CA/2, 40	pH = 2, teplota $40\text{ }^{\circ}\text{C}$
VER_CA/2, L	pH = 2, teplota laboratorní
VER_CA/7, 40	pH = 7, teplota $40\text{ }^{\circ}\text{C}$
VER_CA/7, L	pH = 7, teplota laboratorní

Připravené vzorky byly charakterizovány rentgenovou práškovou difrakcí a infračervenou spektrometrií. Ve vzorcích byl určen obsah uhlíku, na jehož základě byla stanovena stabilita vzorku. Nakonec byla zjištěna antibakteriální účinnost výše uvedených vzorků (Tab. 6).

### 3.5.2 Charakterizace organovermikulitů po testu stability

#### 3.5.2.1 Rtg difrakční analýza

Záznamy rentgenové práškové difrakce vermikulitu a organovermikulitů před a po testu stability jsou zobrazeny na Obr. 32.



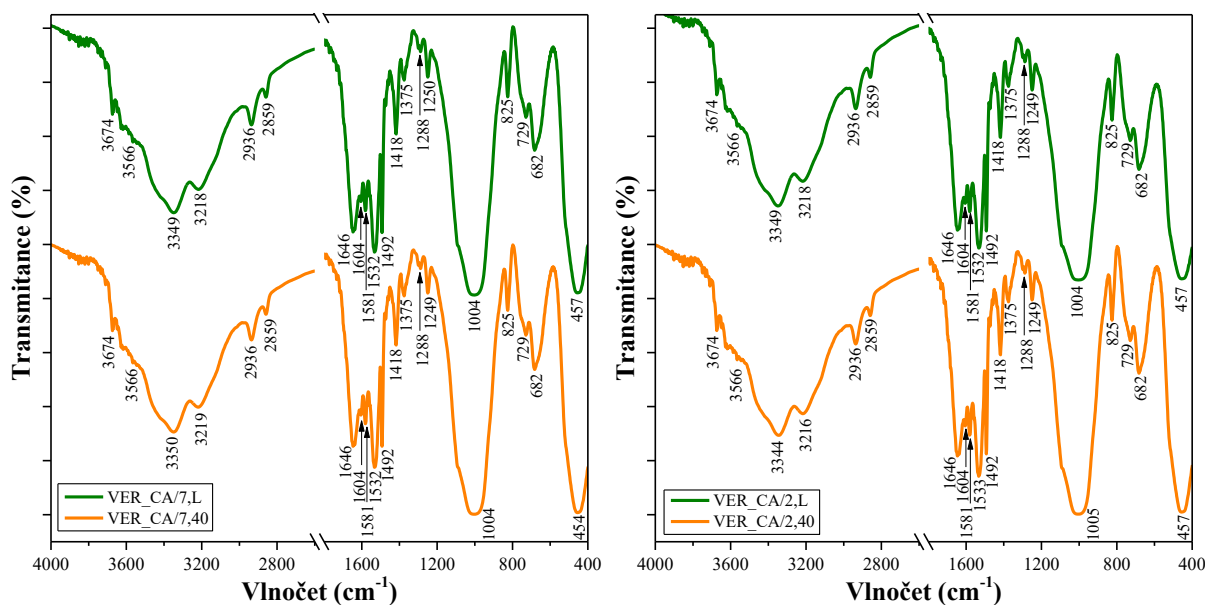
**Obr. 32.** Rtg difrakční záznamy vzorků vermikulitu a organovermikulitů před a po testu stability.

Popis Rtg difrakčních záznamů přírodního vermikulitu VER a organovermikulitu VER\_CA (Obr. 32) je uveden v kap. 3.3.2.1.

U vzorku VER\_CA/7,L po testu stability dochází při porovnání s připraveným organovermikulitem VER\_CA k mírnému snížení mezivrstevních vzdáleností, což lze přisoudit reorganizaci mezivrstevního materiálu v mezivrstvích [118]. V případě vzorku VER\_CA/7, 40 je možné sledovat pokračující trend zmenšujících se mezivrstevních vzdáleností (Obr. 32). U vzorků VER\_CA/2, L a VER\_CA/2, 40 dochází vlivem kyselého loužení k dezorientaci vrstev v jejich po sobě následujícím uložení. Změny v obsazení molekul vody a kationtů v mezivrstevním prostoru se na difrakčním záznamu vzorků VER\_CA/2, L a VER\_CA/2, 40 projeví rozvojením původní bazální reflexe s hodnotou  $d = 1,11$  nm u VER\_CA.

### 3.5.2.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

IČ spektra připravených organovermikulitů po testu stability jsou uvedena na Obr. 33. Při srovnání jednotlivých spekter organovermikulitů po procesu uvolňování nepozorujeme žádné výrazné změny jak v intenzitách, tak v pozici charakteristických absorpčních pásů skupin. Při srovnání IČ spekter vzorků organovermikulitů po procesu uvolňování (Obr. 33) a vzorku výchozího VER\_CA (Obr. 26) vidíme, že došlo k mírnému rozšíření absorpčního pásu v oblasti  $1004\text{ cm}^{-1}$ . Tyto vibrace spolu s vibrací v  $457\text{ cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro Si-O valenční a deformační vibrace. Kromě tohoto rozšíření absorpčního pásu a poklesu jeho intenzity nedošlo k žádné výrazné změně. Na základě tohoto můžeme předpokládat, že během procesu uvolňování, které probíhalo i za zvýšené teploty a při kyselém pH, nedochází k výrazným chemickým či strukturním změnám ve vzorku organovermikulitu VER\_CA.



Obr. 33. IČ spektra organovermikulitů po procesu uvolňování za různých podmínek.

### 3.5.2.3 Stanovení celkového organického uhlíku

Velmi důležitou a přínosnou analýzou této studie bylo stanovení celkového organického uhlíku ve vzorcích. Pro případné budoucí využití organovermikulitů bylo potřeba zjistit stabilitu antibakteriálního účinku, tedy stabilitu chlorhexidinu ve vermikulitové matici.

Stabilita chlorhexidinu byla stanovena na základě simulace procesu uvolňování molekul CA za různých podmínek ve vodném prostředí (kapitola 3.5.1). S ohledem na možné využití vzorku v lékařství (v dutině ústní), byly simulovány podmínky, kdy lidské tělo bojuje se zánětem (zubní, kožní). Standardně se hodnota pH slin v ústech pohybuje mezi 6,0 a 7,5 [119], avšak v případě infekce dochází k poklesu pH (sliny se stávají kyselějšími) vlivem kombinací bakteriálního metabolismu a reakcí imunitního systému [120].

Obsah uhlíku byl u každého vzorku měřen třikrát a poté byly hodnoty měření zprůměrovány. Výsledky analýzy shrnuje Tab. 7. Průměrné množství uhlíku v připraveném základním organovermikulitu VER\_CA bylo  $11,58 \pm 0,07$  %. Tento obsah uhlíku odpovídá 231,6 mg interkalovaného chlorhexidinu v 1 g vzorku, což odpovídá asi 58 % použitého chlorhexidinu pro interkalaci. Z TOC analýzy tedy vyplývá, že pouze necelých 60 % vstupního množství chlorhexidinu bylo interkalováno do vzorku vermikulitu.

**Tab. 7.** Obsah uhlíku (%) v jednotlivých vzorcích.

Vzorek	Skutečný obsah uhlíku (%)	Obsah CA (mg CA/1 g vzorku)	Obsah uhlíku ve vzorku před a po testu stability (%)	Úbytek uhlíku po testu stability (%)
VER_CA	$11,58 \pm 0,07$	231,6	100	-
VER_CA/2, 40	$11,08 \pm 0,01$	221,6	95,68	4,32
VER_CA/2, L	$11,11 \pm 0,02$	222,2	95,94	4,06
VER_CA/7, 40	$10,45 \pm 0,04$	209,0	90,24	9,76
VER_CA/7, L	$11,16 \pm 0,01$	223,2	96,37	3,63

Až na jeden, obsahovaly všechny vzorky po testu stability velmi podobný, téměř shodný obsah organického uhlíku, tedy interkalovaného chlorhexidinu. Úbytek chlorhexidinu ve vzorcích VER\_CA/2, L; VER\_CA/2, 40 a VER\_CA/7, L byl přibližně 4 % v porovnání se základním VER\_CA před testem stability. Největší pokles organického uhlíku byl pozorován u vzorku VER\_CA/7, 40, který byl podroben testu stability při 40 °C a pH = 7. V tomto vzorku klesl obsah interkalovaného chlorhexidinu na 52,4 %, což odpovídá 209 mg chlorhexidinu v 1 g vzorku. Lze předpokládat, že vyšší úbytek (9,76 %) chlorhexidinu po testu stability byl způsoben kombinací vyšší teploty a pH.

Přestože mluvíme o vyšším poklesu obsahu organického uhlíku, tak se jedná o úbytek přibližně 20 mg chlorhexidinu, což je zanedbatelné množství a jak je vidět i v následující kapitole (kapitola 3.5.3), nemá tento úbytek zásadní vliv na antibakteriální aktivitu daného vzorku.

Tyto velmi pozitivní výsledky testu stability nasvědčují tomu, že připravený vzorek organovermikulitu je velmi stabilní i po 24 h a to jak při vyšší teplotě, tak při kyselém pH a rovněž poukazují na možnost využití tohoto vzorku jako materiálu s dlouhodobým antibakteriálním účinkem.

Rovněž jsou značně nižší námi zjištěné hodnoty uvolnění CA, než uvádí literatura. Např. Xu a kol. zjistili uvolnění více než 50 % interkalovaného chlorhexidinu po 24 h při pH = 7,4 [92]. Pro sledování uvolnění chlorhexidinu použili stejný nanokompozit VER\_CA, ale pro jeho přípravu byla použita jiná metoda. Srovnání s výsledky současné studie plyne závěr, že metoda přípravy organovermikulitu hraje významnou roli.

### 3.5.3 Vyhodnocení antibakteriální účinnosti organovermikulitů po testu stability

Antibakteriální účinnost všech vzorků byla testována proti čtyřem klinicky významným bakteriálním kmenům *E. faecalis* (G<sup>+</sup>), *S. aureus* (G<sup>+</sup>), *E. coli* (G<sup>-</sup>) a *P. aeruginosa* (G<sup>-</sup>) v časových intervalech 30 min, 120 min, 240 min, 24 h a 5 dní. Výsledky minimální inhibiční koncentrace, jež je potřebná k zahubení mikroorganismu dokládá níže uvedená Tab. 8.

**Tab. 8.** MIC (% m/V) připravených organovermikulitů.

Vzorek	<i>E. faecalis</i> MIC (% m/V)					<i>S. aureus</i> MIC (% m/V)				
	30 min	120 min	240 min	24 h	5 d	30 min	120 min	240 min	24 h	5 d
<b>VER</b>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<b>VER_CA</b>	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014
<b>VER_CA/2, 40</b>	3,33	10	10	1,11	0,014	1,11	1,11	1,11	0,014	0,014
<b>VER_CA/2, L</b>	3,33	3,33	3,33	3,33	0,014	3,33	1,11	1,11	0,014	0,014
<b>VER_CA/7, 40</b>	10	10	10	3,33	0,014	1,11	1,11	3,33	0,014	0,014
<b>VER_CA/7, L</b>	10	10	10	3,33	0,014	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014

Vzorek	<i>E. coli</i> MIC (% m/V)					<i>P. aeruginosa</i> MIC (% m/V)				
	30 min	120 min	240 min	24 h	5 d	30 min	120 min	240 min	24 h	5 d
<b>VER</b>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<b>VER_CA</b>	3,33	3,33	3,33	0,014	0,014	> 10	> 10	10	10	10
<b>VER_CA/2, 40</b>	3,33	3,33	1,11	0,014	0,014	> 10	> 10	10	10	10
<b>VER_CA/2, L</b>	3,33	3,33	1,11	0,014	0,014	10	> 10	10	10	10
<b>VER_CA/7, 40</b>	3,33	1,11	1,11	0,041	0,041	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<b>VER_CA/7, L</b>	3,33	3,33	3,33	0,041	0,041	10	10	10	10	10

Z výsledků antibakteriálních testů je patrné, že výchozí přírodní vermikulit (VER) nemá podle očekávání žádný antibakteriální efekt. Až po interkalaci vermikulitu chlorhexidinem (VER\_CA) dochází k poklesu MIC. S delší dobou působení klesá rovněž i koncentrace potřebná k inhibici bakteriálního růstu. Výsledky vzorků po procesu uvolňování jsou téměř totožné s výsledky výchozího vzorku VER\_CA. Jelikož na základě výsledků analýzy obsahu uhlíku nedošlo k výraznému poklesu obsahu uhlíku, a tedy i obsahu CA ve vzorcích po procesu uvolňování, předpokládá se, že by vzorky měly projevit velmi podobné antibakteriální chování vůči jednotlivým bakteriálním kmenům.

Výsledky antibakteriálních testů vzorku před i po procesu uvolňování prokázaly téměř shodnou antibakteriální účinnost vůči bakteriálním kmenům (*S. aureus* a *E. coli*). U *E. faecalis* byl u vzorku při pH = 7 nástup antibakteriálního účinku až po 24 h působení. Výsledky antibakteriálních testů proti odolnému kmeni *P. aeruginosa*, dopadly tradičně nejhůř, jelikož zde viditelně nedochází k poklesu MIC a tedy k inhibici bakteriálního růstu.

Ostatní vzorky opět prokázaly dlouhodobý antibakteriální efekt, přičemž nejnižší hodnoty MIC 0,014 % m/V naznačují vysokou antibakteriální účinnost organovermikulitů přetrvávající i po 5 dnech. Dlouhotrvající antibakteriální účinky jsou velmi důležité pro potenciální využití v antibakteriálních materiálech [86].

### 3.5.4 Diskuze

Tato část dizertační práce se zabývala studiem stability účinné látky v připraveném organovermikulitovém vzorku a jeho vlivem na výslednou antibakteriální účinnost. Rentgenová difrakční analýza potvrdila úspěšnou interkalaci chlorhexidinu do mezivrstev vermikulitu. U vzorků po testu stability došlo k poklesu mezivrstevní vzdálenosti, což nasvědčuje přeuspořádání mezivrstevního materiálu. Potvrzení, že nedošlo u vzorků po testu stability k žádné výrazné strukturální změně lze podpořit IČ spektry vzorků po testu stability

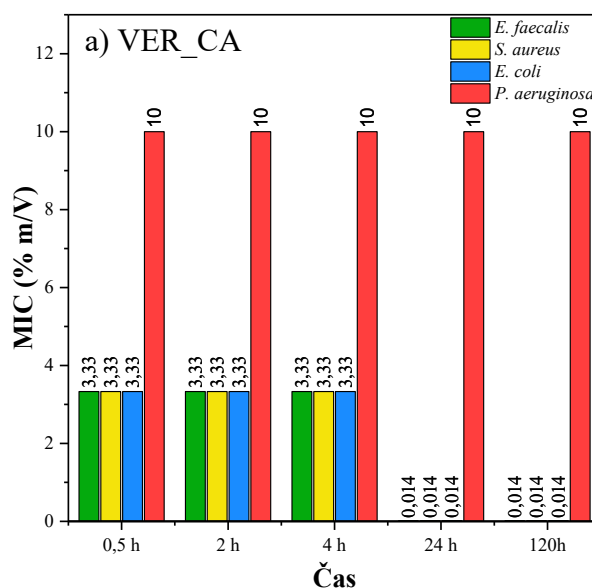


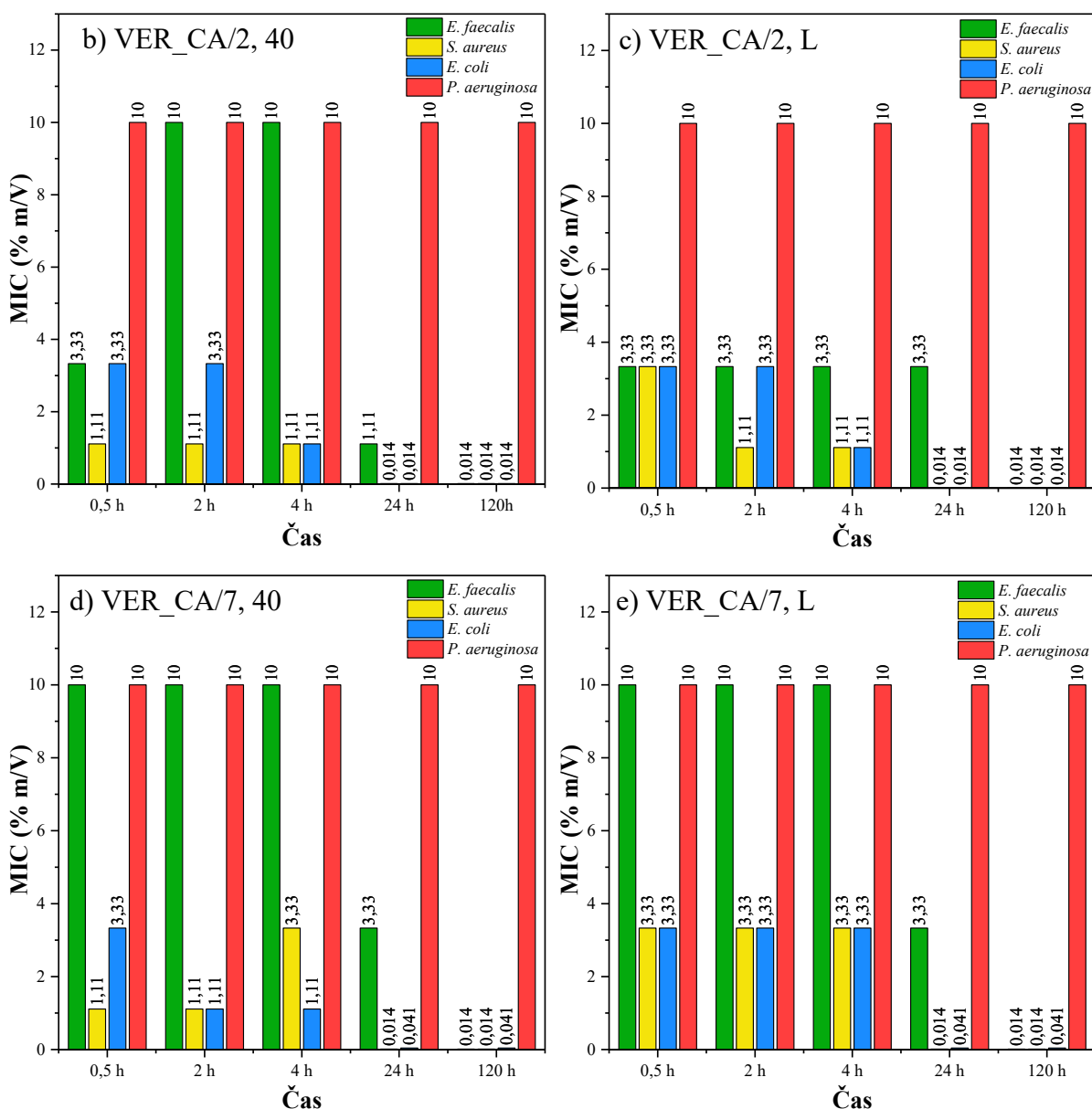
(Obr. 33) ve srovnání s IČ spektry organovermikulitu před testem stability (Obr. 26). Přítomnost chlorhexidinu v připravených vzorcích byla rovněž potvrzena na základě stanovení celkového organického uhlíku.

Obsah uhlíku ve vzorku před procesem uvolňování byl téměř totožný s obsahy uhlíků ve vzorcích po procesu uvolňování. Jelikož jediná složka obsahující uhlík je interkalovaná sloučenina chlorhexidinu, můžeme usoudit, že nedochází k jejímu významnému uvolňování z vermikulitové matrice.

Za účelem vyhodnocení antibakteriální účinnosti, byly všechny organovermikulity po testu stability testovány vůči 4 bakteriálním kmenům. Tyto vzorky vykazaly výrazné dlouhodobé antibakteriální účinky po 24 h expozice proti 3 bakteriálním kmenům (Obr. 34). Na druhou stranu ani jeden organovermikulit nevykázal žádnou antibakteriální účinnost vůči *P. aeruginosa*.

Stabilita a dlouhodobé antibakteriální účinky vermikulitů s interkalovaným chlorhexidinem jsou velmi důležité vlastnosti pro případné využití materiálu v praxi. Výsledky antibakteriálních testů vzorků před a po procesu uvolňování ukázaly podobné výsledky, z čehož můžeme usoudit, že obsah aktivní antibakteriální sloučeniny chlorhexidinu se příliš nezměnil. Toto bylo potvrzeno analýzou obsahu celkového organického uhlíku (Tab. 7). Shodná antibakteriální účinnost všech testovaných vzorků naznačuje, že množství chlorhexidinu větší než 200 mg v 1 g vzorku je dostačující pro zpomalení bakteriálního růstu s dlouhodobým účinkem a rovněž dostatečně stabilní, aby nedocházelo k velkým ztrátám.





**Obr. 34** Porovnání antibakteriální účinnosti vzorků a) VER\_CA, b) VER\_CA/2, 40, c) VER\_CA/2, L, d) VER\_CA/7, 40 a e) VER\_CA/7, L vůči jednotlivým bakteriálním kmenům v závislosti na době působení.

Antibakteriální aktivita organo-jílových minerálů lze popsat pomocí dvou mechanismů. První zahrnuje adsorpci bakteriálních buněk na povrchu jílového minerálu. Samotný vermikulit má hydrofilní povrchové vlastnosti, avšak po interkalaci a navázání chlorhexidinu dochází k změně povrchových vlastností na hydrofobní. Právě tyto hydrofobní částice interagují s lipofilními částmi (lipoproteiny, liposacharidy a fosfolipidy) stěn bakteriálních buněk. Povrch bakteriální buňky nese negativní náboj. Zároveň kationtová výměna původních kationtů ve vermikulitu za kladný antibakteriální chlorhexidin vede k pozitivně nabitému organojílu. Opačně nabitě povrchy organojílu a bakteriální buňky se přitahují pomocí elektrostatických

interakcí. Výsledkem je přitažení bakteriální buňky k povrchu vermikulitu, kde se dostane do kontaktu s chlorhexidinem a následně dochází k jejímu zániku.

Druhý mechanismus zahrnuje uvolnění antibakteriální látky ze struktury organojílu a následným kontaktem takto uvolněné samotné molekuly chlorhexidinu s buňkou bakterie v roztoku dochází k antibakteriální reakci [85].

Na základě těchto pozitivních výsledků můžeme předpokládat dlouhodobé působení tohoto vzorku a navíc s dlouhodobým postupným uvolňováním léčiva. Připravený organovermikulit VER\_CA by se tedy mohl v budoucnu uplatnit jako funkční složka nanokompozitních materiálů s antibakteriálními vlastnostmi s možností využití v oblasti zubního lékařství či materiálového inženýrství.

Výsledkem této studie je závěr, že analýza stanovení obsahu celkového uhlíku ve vzorcích před procesem uvolňování a po procesu uvolňování přinesla téměř totožné hodnoty obsahu uhlíku ve vzorku. Jelikož jediná složka obsahující uhlík je interkalovaná sloučenina chlorhexidinu, můžeme usoudit, že nedochází k jejímu významnému uvolňování z vermikulitové matrice. Toto je velice důležité zjištění, které může být využito v praxi při přípravě vzorků s postupným uvolňováním léčiva.

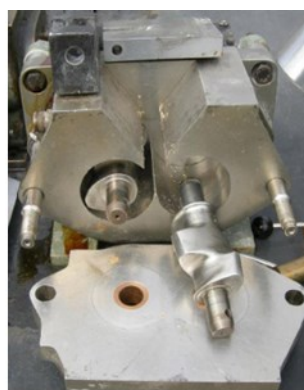
Antibakteriální testy potvrdily dlouhodobé působení organovermikulitu pro všechny testované bakterie s výjimkou *P. aeruginosa*, která je zcela imunní proti připraveným vzorkům. Jelikož na základě analýzy TOC nedošlo k výraznému úniku CA ze vzorku organovermikulitu můžeme usuzovat, že bakterie se musí navázat na povrch organovermikulitu, aby došlo ke kontaktu s molekulou chlorhexidinu a zahájení antibakteriálního účinku.

### 3.6 Nanokompozity polymer/organovermikulit s antibakteriálním účinkem

#### 3.6.1 Příprava vzorků

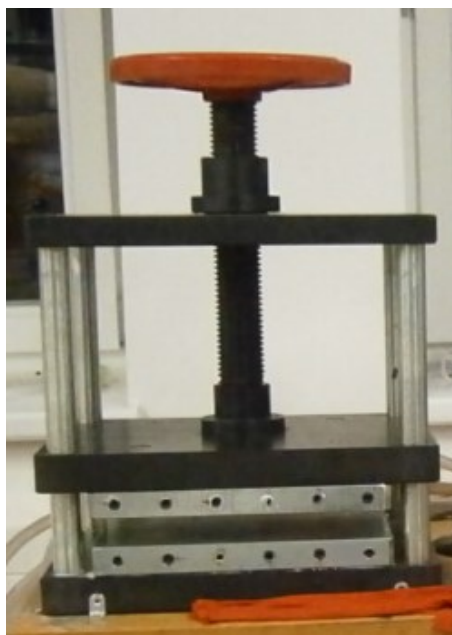
Pro přípravu nanokompozitních PE desek byl jako výchozí jílový minerál použit přírodní vermikulit (VER), který byl nejdříve mletý v kulovém mlýně Retsch (300 ot./min) a následně přesítován na frakci  $< 40 \mu\text{m}$ . Takto upravený vermikulit byl následně převeden dle pracovního postupu popsáno v kapitole 3.3.1 na sodnou a zinečnatou monoionní formu. Spolu s přírodním vermikulitem byly tyto vzorky podrobeny interkalaci s chlorhexidinem (kapitola 3.3.1). Koncentrace CA odpovídala 1x CEC VER. Takto získané vzorky VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA následně sloužily jako nanoplňivo pro přípravu nanokompozitních PE desek.

Matrici nanokompozitního materiálu tvořila směs mletého a granulovaného nízkohustotního polyetylenu (LDPE) Bralen FB 2-17 (Slovnaft, Slovenská Republika). Prvním krokem přípravy nanokompozitních desek bylo smíchání organovermikulitových vzorků VER\_CA, NaVER\_CA a ZnVER\_CA s LDPE v příslušném hmotnostním poměru (Tab. 9). První vzorek obsahoval 1,2 g organovermikulitu (3%) a 38,8 g LDPE. Další vzorky obsahovaly 6 % a 10 % organovermikulitu a k tomu příslušné množství LDPE. Namíchaná směs se poté postupně vsypávala do hnětací komůrky tavícího stroje Brabender (BRABENDER GmbH & Co. KG – 835201.041/815604) (Obr. 35). Tavení probíhalo 10 min při 150 °C s dvěma intervaly otáček hnětacího šneka (Obr. 35) uvnitř komůrky (2 min při 10 ot./min a 8 min při 50 ot./min).



**Obr. 35.** Tavící stroj Brabender s detailem hnětacího šneka.

Vzniklá nanokompozitní hmota byla poté 3 min lisována v ručním elektricky temperovatelném lisu při 160 °C. Dle lisovací šablony vznikla deska o rozměrech 100x100x1 mm (š x d x t), která byla poté postupně chlazená v druhém vodou chlazeném lisu (Obr. 36) po dobu 10 min.



**Obr. 36** Ruční vodou chlazený lis.

Tímto způsobem bylo připraveno celkem 9 nanokompozitních desek, které byly označeny následovně: 3% VER\_CA/PE, 6% VER\_CA/PE, 10% VER\_CA/PE, 3% NaVER\_CA/PE, 6% NaVER\_CA/PE, 10% NaVER\_CA/PE, 3% ZnVER\_CA/PE, 6% ZnVER\_CA/PE a 10% ZnVER\_CA/PE.

Připravené PE desky se dle použitého množství nanoplňiva navzájem výrazně lišily také barevným odstínem (Obr. 37).



**Obr. 37.** Fotografie vylisovaných VER\_CA/PE desek s obsahem 3 %, 6 % a 10 % nanoplňiva.

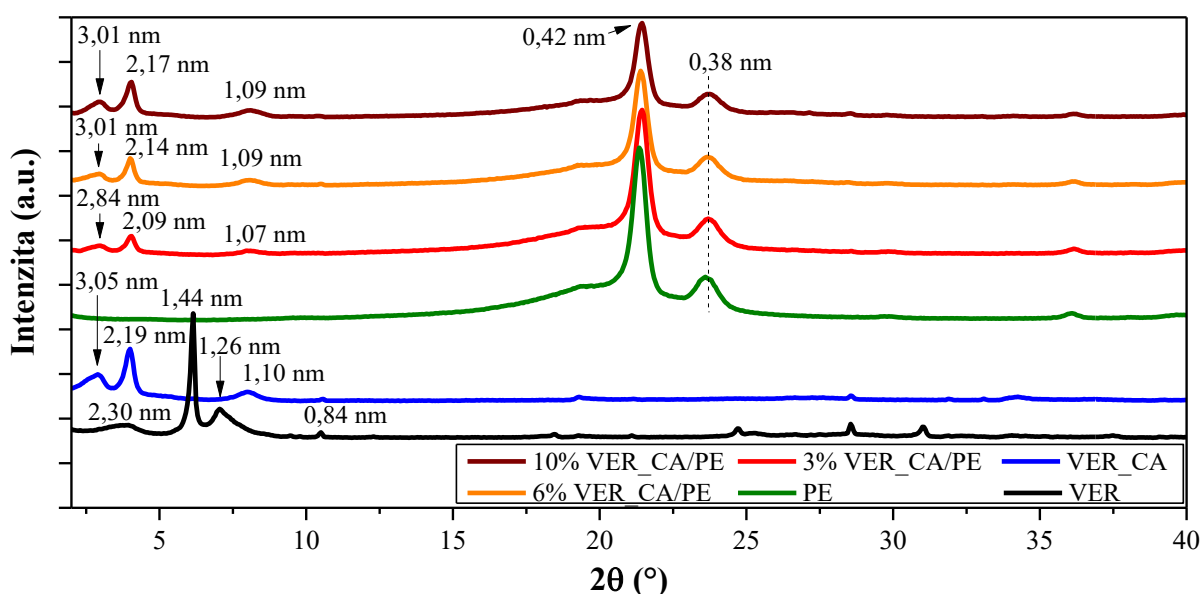
**Tab. 9.** Poměry hmotností směsí pro přípravu nanokompozitních PE desek.

Nanoplňivo			Matrice		
VER_CA,	3 %	1,2 g	LDPE - Bralen	97 %	38,8 g
NaVER_CA,	6 %	2,4 g		94 %	37,6 g
ZnVER_CA	10 %	4,0 g		90 %	36,0 g

### 3.6.2 Charakterizace organovermikulitových polymerních nanokompozitů

#### 3.6.2.1 Rtg difrakční analýza

Popis Rtg difrakčních záznamů vzorků VER a VER\_CA byl již zmiňován v předchozích studiích viz kapitola 3.3.2.1.

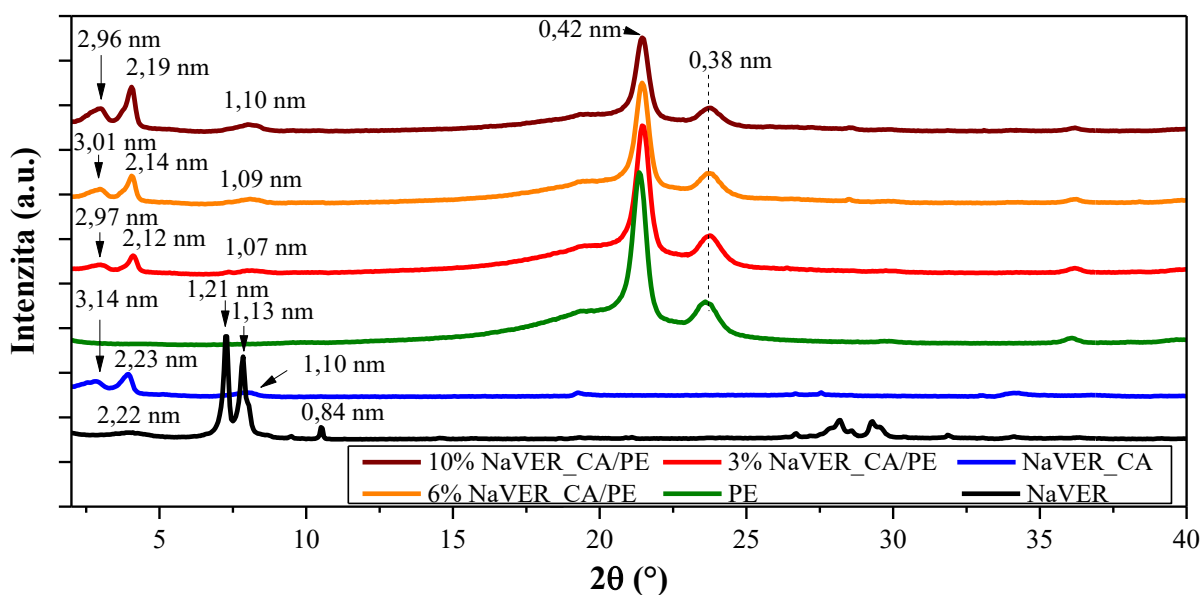


**Obr. 38.** Rtg záznamy přírodního VER, interkalovaného VER\_CA a nanokompozitních VER\_CA/PE desek.

Vlivem interkalace CA došlo k významnému nárůstu mezivrstevního prostoru z 1,44 nm na 3,05 nm, což dokazuje interkalaci molekul CA do struktury VER.

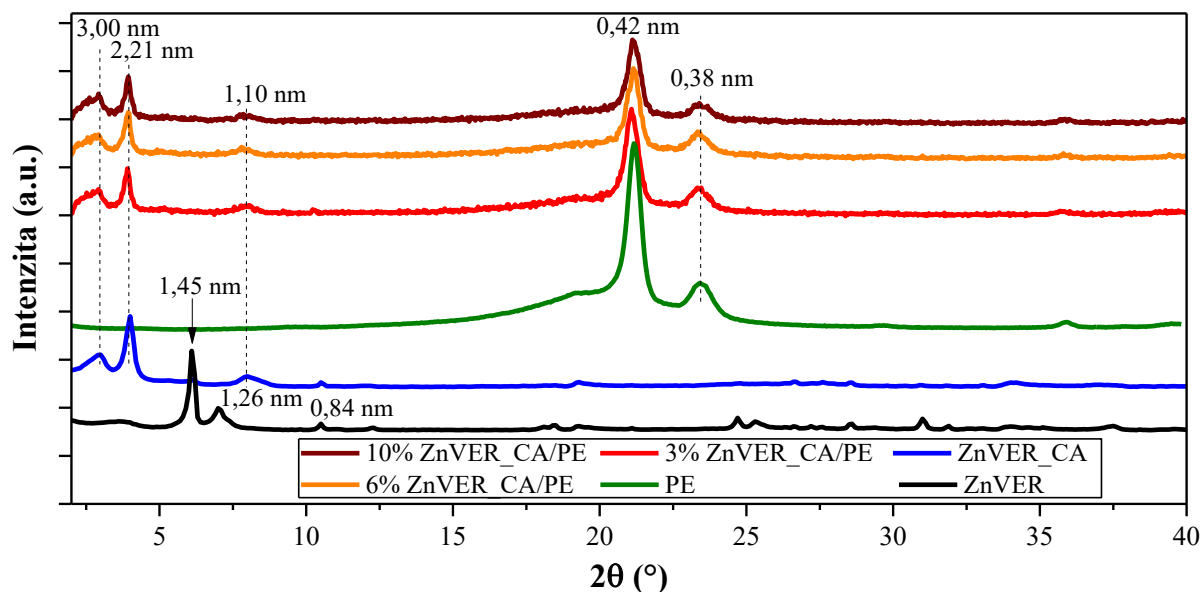
Semikrystalický PE, který obsahuje jak krystalickou, tak amorfni část je charakterizován dvěma difrakcemi s hodnotami  $d(110) = 0,42$  nm a  $d(200) = 0,38$  nm, které odpovídají ortorombické krystalové struktuře LDPE [121]. Rentgenové difrakční záznamy zamíchaných nanokompozitních vzorků 3% VER\_CA/PE, 6% VER\_CA/PE a 10% VER\_CA/PE potvrzují přítomnost antibakteriálního plniva v PE. S rostoucím obsahem nanoplňiva nepatrně klesá mezivrstevní vzdálenost při porovnání s výchozím VER\_CA.

Nejnižší hodnoty mezivrstevní vzdálenosti 1,07 nm, 2,09 nm a 2,84 nm má vzorek desky 3% VER\_CA/PE, přičemž při trojnásobně větším obsahu nanoplňiva má vzorek 10% VER\_CA/PE hodnoty 1,09 nm, 2,17 nm a 3,01 nm, avšak stále je zde patrný rozdíl ve vzdálenosti vůči výchozímu VER\_CA. V Rtg difrakčních záznamech jednotlivých PE desek se s rostoucím obsahem plniva zvyšuje intenzita difrakce superstruktury, jež vznikla interstratifikací jedné vrstvy hydratovaných molekul v oblasti 2,1 nm.



**Obr. 39.** Rtg difrakční záznamy NaVER, NaVER\_CA a nanokompozitních PE desek.

Výše uvedené rentgenové difrakční záznamy (Obr. 39) dokládají interkalaci CA do mezivrství NaVER vznikem difrakce s hodnotou mezivrstevní vzdálenosti  $d = 3,14$  nm. Při porovnání hodnot bazálních difrakcí jednotlivých vzorků 3% NaVER\_CA/PE, 6% NaVER\_CA/PE a 10% NaVER\_CA/PE, vyskytujících se v oblasti  $2\theta = 2,5 - 5^\circ$  je patrné, že se zvyšujícím se obsahem organovermikulitového nanoplňiva v PE desce nedochází ke změnám v rozměrech mezivrstevního prostoru. Při srovnání Rtg záznamů PE nanokompozitních desek VER\_CA/PE a NaVER\_CA/PE lze pozorovat velmi nepatrné rozdíly mezivrstevních vzdáleností, které se však pohybují v rozptylu opakovaných měření a tudíž lze usoudit, že strukturně jsou si tyto nanokompozity velmi podobné.



**Obr. 40.** Rtg difrakční záznamy ZnVER, ZnVER\_CA a nanokompozitních PE desek.

Interkalace CA do vzorku ZnVER je opět potvrzena zvýšením hodnot mezivrstevní vzdálenosti z 1,45 nm na 3,0 nm (Obr. 40). Semikrystalický LDPE je opět znázorněn s intenzivní reflexí  $d(110) = 0,42$  nm a  $d(200) = 0,38$  nm. Rentgenové difrakční záznamy jednotlivých nanokompozitů 3% ZnVER\_CA/PE, 6% ZnVER\_CA/PE a 10% ZnVER\_CA/PE nevykazují žádné změny mezivrstevního prostoru. Předpokládáme tedy, že nedošlo k žádné významné strukturní změně či snad exfoliaci v polymerní matici.

### 3.6.2.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

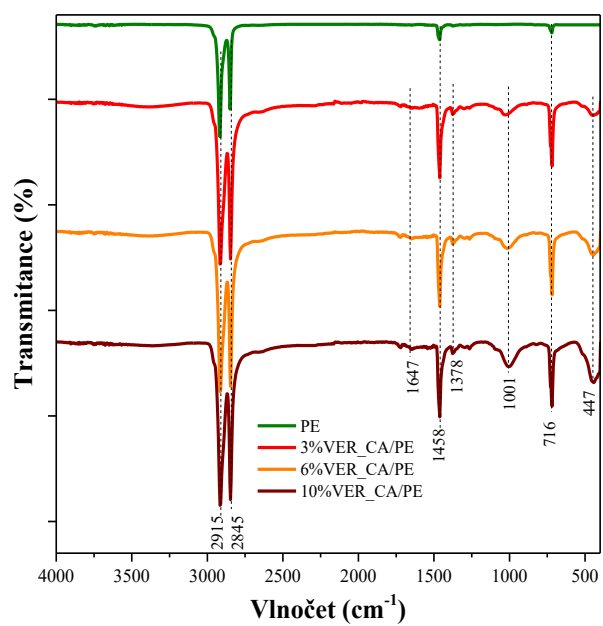
Změřená IČ spektra polymerních nanokompozitních desek jsou vykreslena ve třech společných grafech (Obr. 41), kde graf a) zobrazuje spektrum nanokompozitních PE desek s VER\_CA nanoplnivem v různých hmotnostních poměrech a čistý PE k porovnání. Graf b) zobrazuje spektrum NaVER\_CA/PE desek spolu s čistým PE a graf c) předkládá spektra ZnVER\_CA /PE desek a čistý PE.

Spektra tří souborů jednotlivých PE desek s různými nanoplnivy se od sebe vzájemně příliš neliší. Hodnoty významných vibrací jsou velice podobné a dosvědčují přítomnost organovermikulitového plniva v PE.

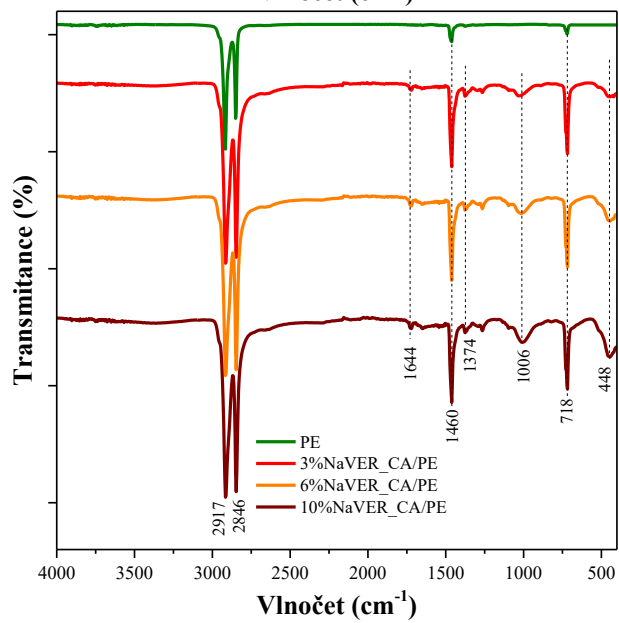
Ve spektru pro čistý PE (Obr. 41) vidíme charakteristický rozštěpený dvojitý pás asymetrických a symetrických valenčních vibrací C-H při  $2915\text{ cm}^{-1}$  a  $2845\text{ cm}^{-1}$  spolu s deformačními vibracemi C-H v  $1458\text{ cm}^{-1}$  a rovinnou asymetrickou kývavou vibrací C-H vazeb v  $719\text{ cm}^{-1}$ . Pokud má polymer podstatnou část řetězce větvenou, pozorujeme přídatný pík v  $1378\text{ cm}^{-1}$ . Tyto vibrační pásy jsou charakteristické pro LDPE [121].

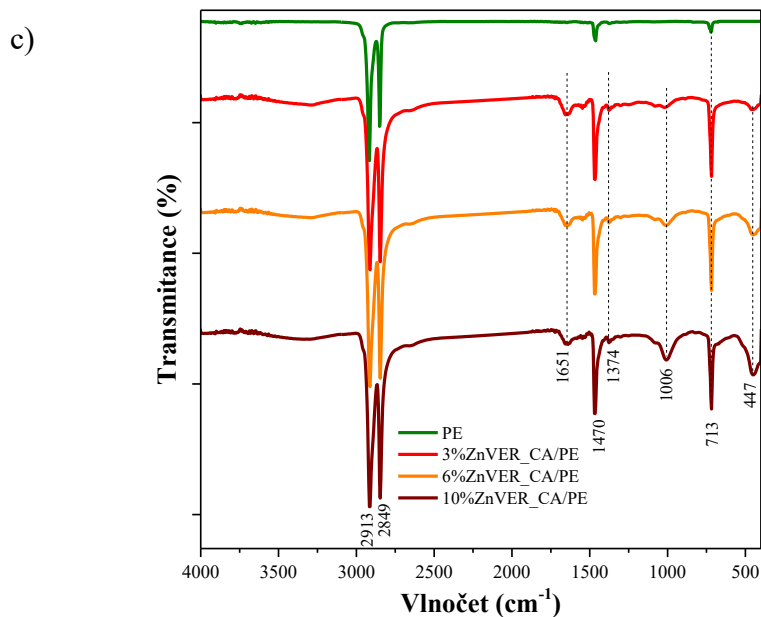


a)



b)



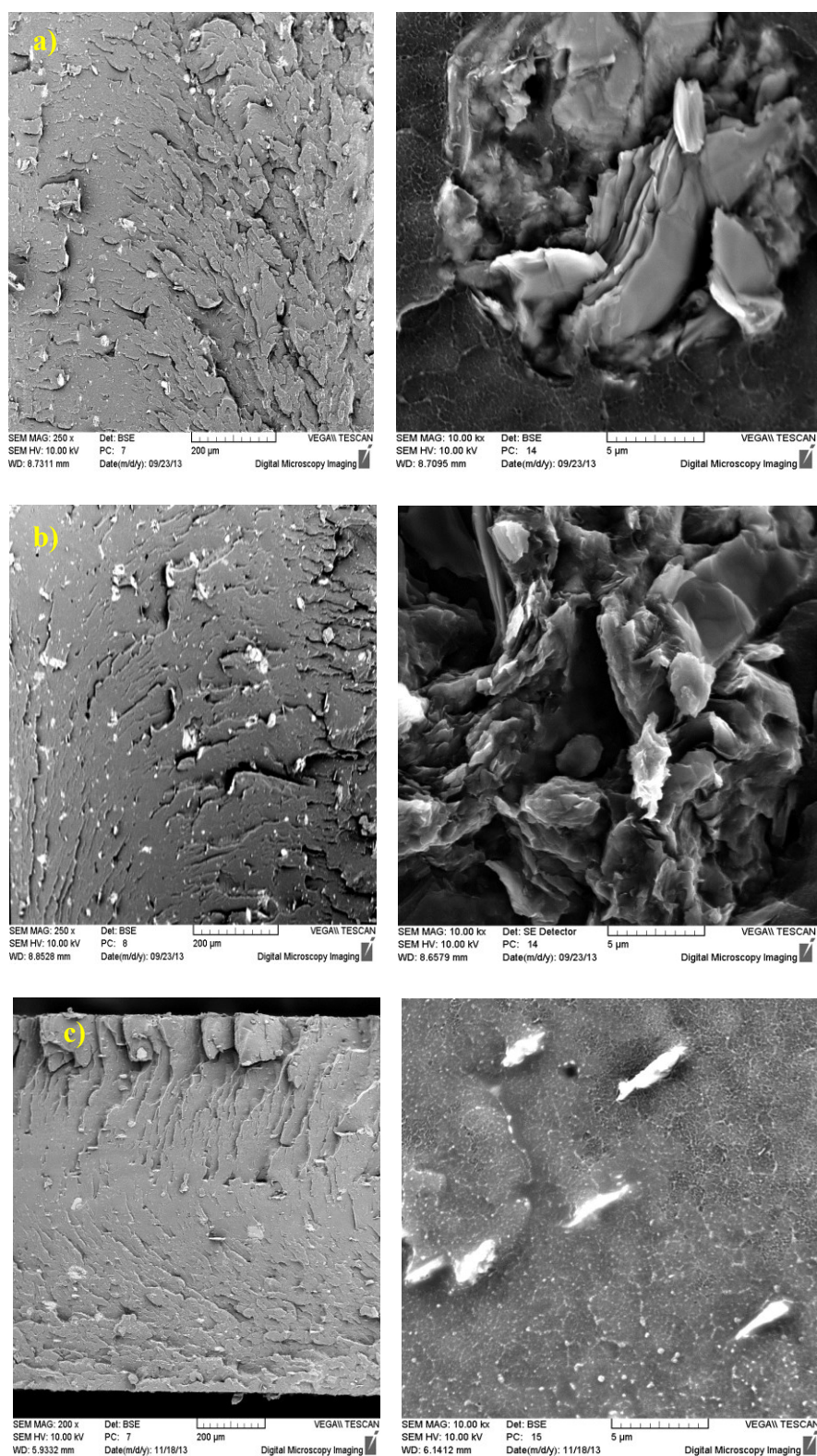


**Obr. 41.** IČ spektra připravených nanokompozitních PE desek a) VER\_CA/PE, b) NaVER\_CA/PE, c) ZnVER\_CA/PE s různým obsahem organovermikulitu a spektrum čistého PE.

V IČ spektrech nanokompozitních desek můžeme vidět absorpční pás s vlnočty 1001 - 1006  $\text{cm}^{-1}$  náležící Si-O valenčním vibracím spolu s vlnočtem 447  $\text{cm}^{-1}$ , jenž náleží Si-O vibracím deformačním [112]. Tyto vibrace nám naznačují přítomnost vermikulitu v PE desce. Zároveň si můžeme všimnout, že se zvyšujícím se obsahem nanoplniva roste rovněž intenzita valenční vibrace Si-O v 1006  $\text{cm}^{-1}$  [113]. Přítomnost CA ve vzorku lze pozorovat vznikem nových vibrací v oblasti 1651 – 1644  $\text{cm}^{-1}$ , které charakterizují valenční vibrace C=N iminových skupin CA [107]. Další charakteristické vibrace (asymetrické  $\sim 2937 \text{ cm}^{-1}$  a symetrické  $\sim 2860 \text{ cm}^{-1}$  vibrace C-H vazeb CA) jsou zcela určitě překryty absorpčními pásy PE, což je především způsobeno hmotnostním poměrem polymeru a plniva.

### 3.6.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Pro charakterizaci vzniklé struktury, byla zvolena optická metoda SEM. Snímky SEM byly pořízeny na půdě Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Pro porovnání byly vybrány vždy desky s obsahem 10% nanoplniva.



**Obr. 42.** SEM snímky PE desek: a) 10% VER\_CA/PE, b) 10% NaVER\_CA/PE a c) 10% ZnVER\_CA/PE.

Na prvním snímku každé série (Obr. 42), lze pozorovat strukturu materiálu v řezu. Vidíme celkem homogenní zastoupení nanoplňiva v matici, přičemž velikost částic nanoplňiva

je různorodá. Při větším rozlišení můžeme rozlišit jednotlivé vrstvy struktury organovermikulitu, mezi něž je zamíchán PE. To lze vidět i na posledním detailním snímku, kde PE matrice obklopuje částičky organovermikulitu. Tento pohled nám zároveň potvrzuje tvrzení z RTG difrakčních záznamů, že došlo k exfoliaci vrstevnaté struktury.

Na posledních snímcích (Obr. 42c) je zachycena struktura povrchu PE desky, na níž vidíme, že během tuhnutí desky, kdy dochází k smršťování PE, zůstaly některé vrstvičky nanoplňiva vyčnívající z povrchu desky.

### 3.6.3 Vyhodnocení antibakteriální účinnosti organovermikulitových polymerních materiálů

Antibakteriální aktivita připravených destiček byla stanovována otiskovou metodou (kapitola 3.2.5.2) proti vybraným bakteriálním kmenům *E. coli* CCM 3954 ( $G^-$ ) a *S. aureus* CCM 3953 ( $G^+$ ). Hustota populace testovacího kmene *E. coli* v 1 ml změřená denzitometrem byla  $2,0 \times 10^5$  cfu.ml<sup>-1</sup> a pro *S. aureus*  $1,5 \times 10^5$  cfu.ml<sup>-1</sup>.

Každá z vylišovaných PE desek byla rozříznuta na 4 menší čtverce o rozměru 50x50 mm. Na jednu stranu destičky byla nanesena suspenze bakteriálního kmene o objemu 25 µl. Poté byly destičky překryty alobalem, z důvodu ochrany před světlem a vnějšími vlivy, a přemístěny do laminárního boxu, kde probíhalo při 21 °C zaschnutí bakteriální suspenze. Po zaschnutí byly provedeny první přímé otisky na plotnu krevního agaru v Petriho misce. Každá deska byla otištěna 3x. Kultivace probíhala 24 h při  $35 \pm 2$  °C. Výsledky se poté odečítaly za 24, 48, 72 a 96 h, přičemž výsledkem je myšlen počet jednotek tvořící kolonii (CFU). Do tabulky Tab. 10 a Tab. 11 byly zaznamenány průměry počtu CFU ze tří otisků desek. Pokud bakteriální kolonie na misce splývaly, byl jejich počet označen jako nepočitatelné množství (NM).

Následující výsledky antibakteriálních testů náleží bakterii *S. aureus*. V níže uvedené tabulce (Tab. 10) jsou zaznamenány průměry počtu jednotek bakterií, které tvoří kolonie v časovém sledu 24, 48, 72 a 96 h. Z výsledků antibakteriálních testů jasně vyplývá, že s rostoucím časem působení vždy klesá počet CFU bakterií. Je zřejmé, že s rostoucím obsahem antibakteriálního plniva také klesá počet CFU za čas. Celkově nejlepších výsledků dosáhlo plnivo NaVER\_CA, které ve všech koncentracích mělo klesající tendenci pro CFU. Po delší době expozice (po 72 a 96 h) však ještě lepších výsledků dosáhl vzorek VER\_CA a to konkrétně vzorky 6% VER\_CA/PE a 10% VER\_CA/PE. Zdaleka nejhůře dopadlo nanoplňivo ZnVER\_CA, které ani po 48h nemělo vůči *S. aureus* žádnou antibakteriální účinnost. Ani po

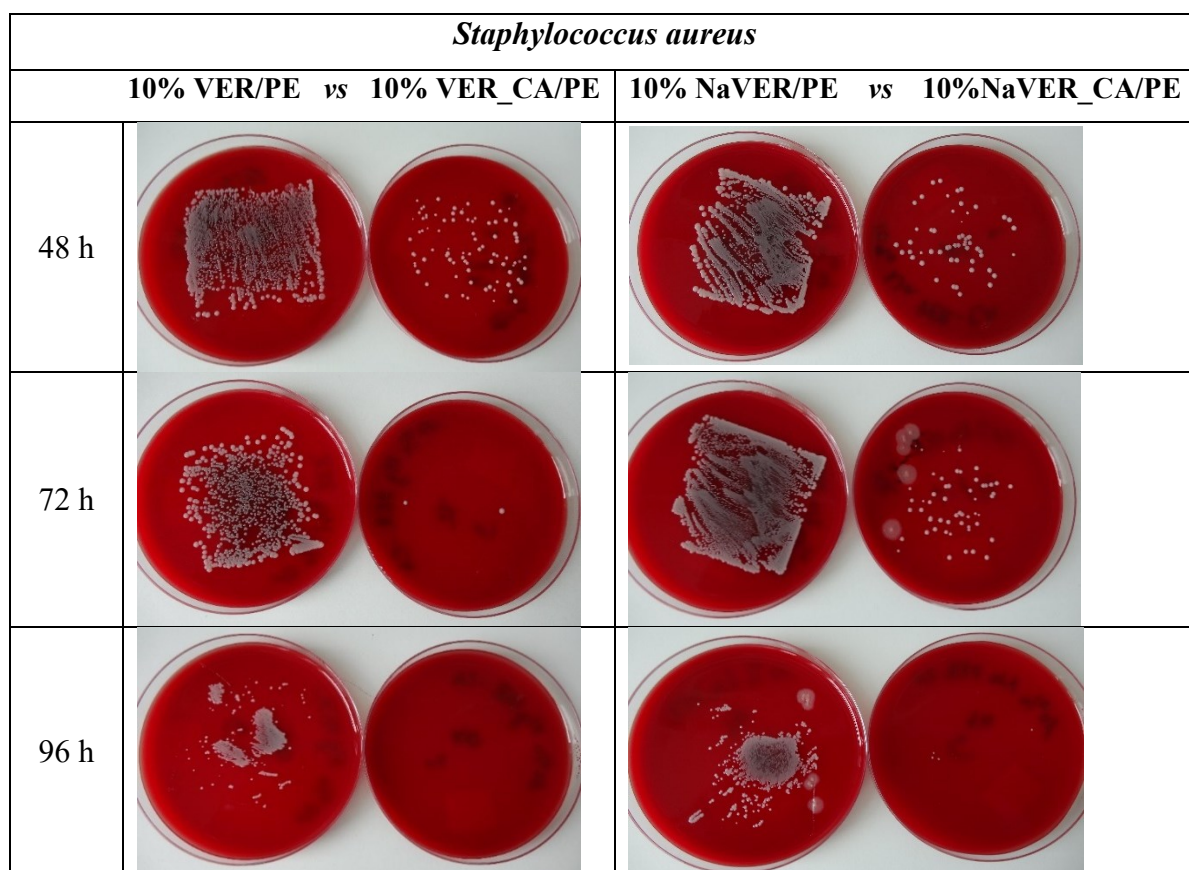
delší době působení se neprojevil výrazný antibakteriální efekt, jelikož konečné výsledky měly vysoký počet CFU. Toto zjištění zřejmě může souviset s výsledky Rtg záznamů PE desek ZnVER\_CA/PE, kde nedošlo k posunu mezivrstevního prostoru. Snad jiné uspořádání struktury ZnVER\_CA/PE ovlivňuje takto negativně výsledky antibakteriálního působení.

**Tab. 10** Průměrný počet CFU *S. aureus* v čase.

Destičky PE a nanoplňiva	Pokles počtu CFU <i>S. aureus</i> v čase			
Doba kontaktu bakterií	24 h	48 h	72 h	96 h
PE	NM	NM	NM	NM
3% VER_CA/PE	218	111	47	30
6% VER_CA/PE	181	64	6	10
10% VER_CA/PE	154	52	1	1
3% NaVER_CA/PE	168	104	9	20
6% NaVER_CA/PE	56	42	26	6
10% NaVER_CA/PE	76	37	31	3
3% ZnVER_CA/PE	NM	NM	NM	NM
6% ZnVER_CA/PE	NM	NM	NM	73
10% ZnVER_CA/PE	NM	NM	220	63

Na obrázku (Obr. 43) vidíme fotografie Petriho misek s výsledky otiskové metody pro vzorky s 10% obsahem nanoplňiva. Fotografie v levé části obrázku porovnávají otisky desek bez chlorhexidinu (10% VER/PE) a s chlorhexidinem (10% VER\_CA/PE, s koncentrací 1xCEC CA ve VER) v čase 48, 72 a 96 h. V pravé části jsou pak vyfotografovány otisky desek NaVER/PE a NaVER\_CA/PE. Na první pohled je patrný rozdíl mezi deskami, které obsahují CA a které nikoliv. Na otiscích po 72 h je patrné, že vzorek VER\_CA/PE má lepší antibakteriální efekt než NaVER\_CA/PE. Po 96 h však oba vzorky již vykazují vynikající antibakteriální účinnost, protože lze vidět, že téměř žádná kolonie na agarovém základu nepřežila. Z těchto výsledků můžeme usoudit, že připravené nanokompozitní polymerové desky budou vykazovat antibakteriální účinnost především po delší době expozice. Toho efektu lze využít v mnoha různých aplikacích.

Fotografie vzorku ZnVER/PE a ZnVER\_CA/PE nebyly pořízeny, neboť nebyl vidět žádný znatelný rozdíl v počtu CFU a nanokompozit neprojevil téměř žádný antibakteriální efekt vůči *S. aureus*.



**Obr. 43** Fotografické znázornění postupného působení nanokompozitního plniva v čase.

Dále jsou v textu uvedeny výsledky testů pro bakterii *E. coli*. Výsledky (Tab. 11) nejsou na první pohled tak jednoznačné jak u předchozích testů pro *S. aureus*, avšak trend poklesu počtu CFU v závislosti na čase je zřejmý i u těchto vzorků. Nejlepších výsledků dosáhl 10% NaVER\_CA/PE. Dobrých výsledků, při delší době působení (72 a 96 h), dosáhl také vzorek ZnVER\_CA/PE. Nejhorší výsledky byly pozorovány u vzorku VER\_CA/PE. Na druhou stranu zajímavostí je, že toto plnivo (VER\_CA) nejlépe působilo při nejnižším zastoupení v PE matrici, tudíž při 3%.

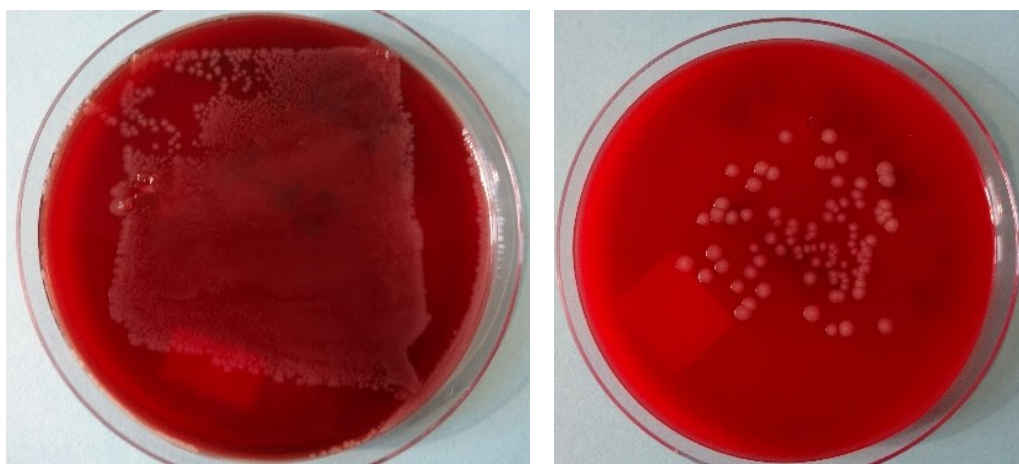
Při porovnání výsledků antibakteriálních testů *S. aureus* a *E. coli*, můžeme jednoznačně říct, že *S. aureus* prokázal menší odolnost vůči připraveným organovermikulitovým nanokompozitům. Počet CFU *S. aureus* byl výrazně nižší v porovnání s *E. coli*, z toho vyplývá, že testované desky prokázaly svůj antibakteriální charakter. Zajímavostí, kterou tato studie přinesla je, že vzorek VER\_CA/PE vykázal proti *S. aureus* velice příznivý antibakteriální účinek (96 h, 1-30 CFU), kdežto při testování proti *E. coli* neprokázal VER\_CA/PE prakticky žádný antibakteriální efekt (po 96 h, 52-300 CFU). Naopak tomu bylo u vzorku ZnVER\_CA/PE, který při testech proti *S. aureus* projevil velice slabý antibakteriální účinek (po 96 h, 63-NM CFU) a poté u *E. coli* dosáhl překvapivě dobrých výsledků



(po 96 h, 15-50 CFU). S rostoucí dobou působení lze pozorovat rapidní pokles CFU především u vzorku 6% ZnVER\_CA/PE.

**Tab. 11** Průměrný počet CFU *E. coli* v čase.

Destičky PE a nanoplňniva	Pokles počtu CFU <i>E. coli</i> v čase			
Doba kontaktu bakterií	24 h	48 h	72 h	96 h
PE	NM	NM	NM	NM
3% VER_CA/PE	NM	179	81	101
6% VER_CA/PE	NM	NM	NM	300
10% VER_CA/PE	NM	NM	194	52
3% NaVER_CA/PE	NM	142	30	16
6% NaVER_CA/PE	NM	152	43	42
10% NaVER_CA/PE	88	92	22	9
3% ZnVER_CA/PE	169	80	57	50
6% ZnVER_CA/PE	278	173	28	15
10% ZnVER_CA/PE	257	135	122	39



**Obr. 44** 10% NaVER/PE a 10% NaVER\_CA/PE po 24 hod expozice *E. coli*.

Na obrázku výše (Obr. 44) je porovnání 10% vzorku NaVER/PE a NaVER\_CA/PE, jenž měl nejlepší antibakteriální působení proti *E. coli*. Lze vidět, že nanokompozitní desky bez obsahu antibakteriální sloučeniny (vlevo) mohou být vhodným prostředím pro růst škodlivých bakterií.

### 3.6.4 Diskuze

Poslední studie byla zaměřena na využití připravených práškových organovermikulitů s antibakteriálním účinkem jako nanoplňniv pro polymerní matrice využitelné v praxi. Jedním

z možných využití je příprava nanokompozitních polymerních materiálů, jež jako nanoplňivo využívají organovermikulity s antibakteriálním efektem, přičemž právě antibakteriální účinek je žádoucí vlastností výsledného polymerního kompozitu.

Cílem této studie byla příprava PE desek s obsahem organovermikulitového nanoplňiva, které v konečné fázi budou vykazovat pokud možno dlouhodobý antibakteriální účinek. Výsledky Rtg analýzy vzorků VER\_CA/PE, NaVER\_CA/PE, ZnVER\_CA/PE potvrdily přítomnost organovermikulitového plniva v PE deskách. S rostoucím obsahem nanoplňiva nedošlo ke změně mezivrstevní vzdálenosti, spíše při porovnání s výchozím organovermikulitem došlo k mírnému snížení hodnot mezivrstevní vzdálenosti. Žádná výrazná změna se na Rtg záznamech neprojevila.

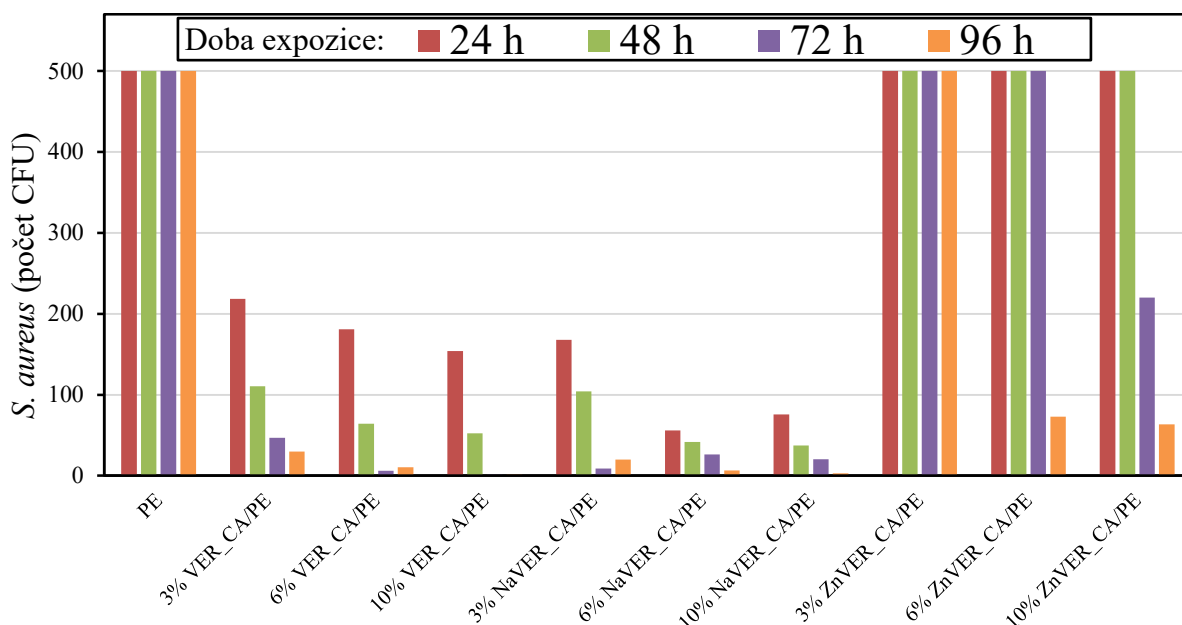
Přítomnost organovermikulitového plniva v PE deskách bylo potvrzeno IČ spektrometrií, kde lze pozorovat charakteristické vibrace jak vermikulitu tak chlorhexidinu. Spektra nanokompozitních desek také potvrzují přítomnost plniva v polyetylenové matici.

Fotografie SEM analýzy dokládají, že vzniklý nanokompozit má homogenní uspořádání plniva v matici. Pozorujeme jednotlivé vrstvičky organovermikulitu mezi něž je vmezežen PE.

Antibakteriální účinnost PE desek byla testována proti bakteriálnímu kmeni *S. aureus* (G<sup>+</sup>) a *E. coli* (G<sup>-</sup>) otiskovou metodou. Z výsledků tohoto testování jasně vyplynulo, že univerzálním vzorkem, odolným vůči gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím je NaVER\_CA/PE. U všech PE desek bylo potvrzeno, že s rostoucím obsahem nanoplňiva a dobou působení je dosaženo lepších antibakteriálních výsledků. Zajímavé výsledky byly získány pro vzorky ZnVER\_CA/PE a VER\_CA/PE. Kdy oba měly opačný efekt při působení na bakterie. Vzorek ZnVER\_CA/PE jevil velice dobré účinky proti bakterii *E. coli*, přičemž při působení na *S. aureus* nejevil téměř žádný antibakteriální efekt. Naopak vzorek VER\_CA byl aktivní u *S. aureus* a při působení na *E. coli* tento vzorek selhal a vykázal velmi vysoké hodnoty CFU.

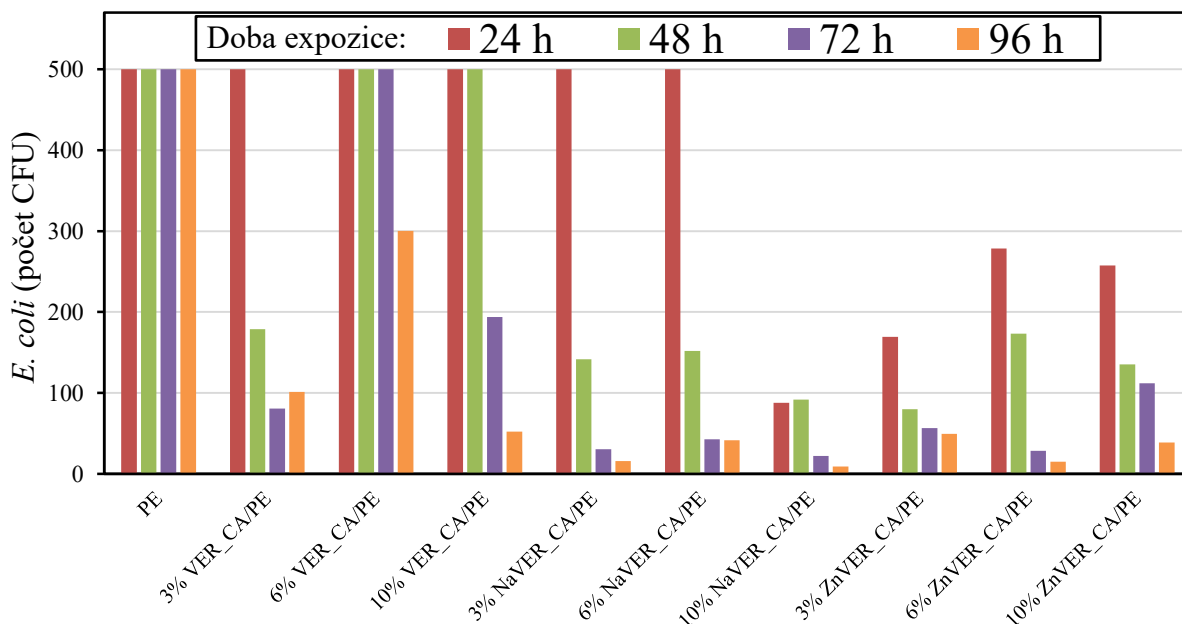
Pokles CFU *S. aureus* v přítomnosti všech kompozitních organovermikulitů v závislosti na čase je znázorněn na následujícím obrázku (Obr. 45).





**Obr. 45** Závislost počtu CFU *S. aureus* v přítomnosti jednotlivých vzorků v čase.

Jsou zde uvedeny všechny testované PE desky. Přehledně lze pozorovat prudký pokles v počtu CFU během prvních 24 h pro vzorky VER\_CA/PE a NaVER\_CA/PE. Naopak vysoký počet CFU, který se s časem nemění, můžeme pozorovat u vzorku ZnVER\_CA/PE.



**Obr. 46.** Závislost počtu CFU *E. coli* v přítomnosti jednotlivých vzorků v čase.

V graficky znázorněné závislosti počtu CFU *E. coli* na čase (Obr. 46) vidíme, že pokles počtu CFU bakterií není tak prudký během prvních 24 h, jako tomu bylo u *S. aureus*. Pokles

CFU u jednotlivých vzorků je spíše pozvolný. Výraznější stagnace růstu nastává až po 72 h působení. Přičemž, již zmíněný VER\_CA/PE má velice špatnou antibakteriální ochranu i po delší době působení.

Závěrečná studie věnována přípravě nanokompozitních PE desek s obsahem organovermikulitového plniva je velice důležitá především z hlediska využitelnosti připravených práškových vzorků v průmyslu. Jednou z možností je právě příprava polymerního nanokompozitu, jež v dnešní době patří k hojně využívaným materiálům.

Všechny PE desky s obsahem organovermikulitu opět prokázaly dlouhodobý antibakteriální účinek, který nebyl omezen zamícháním antibakteriálního plniva do PE matrice. Univerzálním vzorkem, který působí jak na gram-pozitivní i gram-negativní bakterie je NaVER\_CA/PE. Toto zjištění dělá z těchto kompozitů materiály s širokým spektrem uplatnitelnosti.

## 4 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývá přípravou antibakteriálních organo-anorganických hybridních materiálů. Anorganickou složkou je jílový minerál vermikulit a organickou je chlorhexidin, který výslednému hybridnímu materiálu dodává antibakteriální charakter. Tato práce se skládá ze čtyř částí.

Iontovýměnné reakce jsou běžnými postupy přípravy a úprav jílových minerálů. Úkolem první části práce bylo zjistit, jaký vliv mají iontovýměnné reakce na výslednou antibakteriální účinnost organovermikulitů, které byly připraveny z monoionních forem vermikulitů VER, NaVER a ZnVER, a jejich CA interkalovaných forem. Výsledkem bylo zjištění, že jednotlivé organovermikulity prokázaly velice specifické antibakteriální účinky vůči jednotlivým bakteriálním kmenům. Nejefektivněji působil vzorek NaVER\_CA, kdy došlo k inhibici bakteriálního růstu *S. aureus* a *E. coli* již po 30 min působení. Při dlouhodobém působení (24 h a více) dochází k výraznému antibakteriálnímu účinku u bakterií *S. aureus*, *E. coli* i *E. faecalis*. Tento vzorek tedy působil jak na gram-pozitivní, tak gram-negativní bakterie a to již po krátké době expozice. Z dlouhodobého hlediska (24 h působení) prokázal velmi dobré antibakteriální působení také VER\_CA, avšak nástup účinku byl vůči výše uvedeným bakteriím pomalejší než u vzorku NaVER\_CA. Z těchto výsledků vyplývá, že oba vzorky NaVER\_CA i VER\_CA jsou vhodné pro potřebu dlouhodobého antibakteriálního působení.

Vzorek ZnVER\_CA vykazoval rychlý nástup účinku (po 30 min) avšak pouze proti bakteriálnímu kmeni *S. aureus*. Vůči druhému gram-pozitivnímu kmeni *E. faecalis* nastal antibakteriální účinek až po 5 dnech působení. Závěrem je poznatek o významnosti přípravy monoionních forem organovermikulitů při znalosti jejich specifických účinků. Při přípravě antibakteriálních materiálů je zahrnutí přípravy monoionních forem vermikulitů významným stupněm přípravy vzorků, s ohledem na jeho budoucí využití (dlouhodobé působení či rychlý nástup účinku). Dle toho lze zvolit pro rychlé nástupy účinky např. NaVER\_CA a pro dlouhodobější pak stačí VER\_CA, kde není potřeba úprava výchozího materiálu iontovýměnnou reakcí.

Ve druhé části této práce byl studován vliv mechanické a chemické úpravy výchozího vermikulitu na koncovou antibakteriální schopnost. Výchozí kulově mletý VER byl dále pomlet v tryskovém mlýnu (vzorek VERj). Vzorky VER a VERj byly podrobeny acidifikaci za účelem aktivace povrchu a následně interkalaci CA. Srovnáním výsledků antibakteriální účinnosti bylo zjištěno, že mechanická modifikace (tryskové mletí) vzorku VERj\_CA pozitivně ovlivnila

antibakteriální působení vůči *E. faecalis* a *E. coli*, kde bylo dosaženo lepších antibakteriálních výsledků, než u vzorku VER\_CA klasicky mletého v kulovém mlýně. Vliv mechanické modifikace se neprojevil pouze u vzorku *S. aureus*, kde MIC byla stejná jak u VER\_CA, tak VERj\_CA. Proti bakterii *P. aeruginosa* vzorky neměly žádnou antibakteriální aktivitu. Po acidifikaci celkově prokázaly vzorky VERa\_CA a VERja\_CA lepší antibakteriální účinnost, než jen mleté vzorky organojílů. Nástup antibakteriálního účinku, zde byl již po 30 min působení a velmi dobré výsledky byly získány při testování odolné bakterie *P. aeruginosa*. Hodnoty MIC klesly u VERja\_CA již po 30 min působení u VERa\_CA pak po 24 h. Tyto pozitivní výsledky jsou důsledkem kyselinového loužení v kombinaci s tryskovým mletím, kde obě techniky narušují strukturní uspořádání vermikulitu, dochází k amorfizaci a zvětšení aktivního povrchu, což má za následek vyšší antibakteriální účinnost organojílu. Výborných výsledků proti velmi odolné bakterii *P. aeruginosa* lze využít při uplatnění těchto modifikovaných vzorků v praxi. Souhrnně tedy všechny připravené vzorky prokázaly dlouhodobou (24h a více) schopnost inhibovat bakteriální růst. Nutnost provádět acidifikaci vzorku, lze doporučit v případech, kdy potřebujeme cíleně snižovat bakteriální růst *P. aeruginosa*. V případě ostatních bakterií je postačující modifikace ať už kulovým či tryskovým mletím, u kterých je zaručen stejný dlouhodobý antibakteriální efekt.

Velice důležitou charakteristikou koncového antibakteriálního produktu je stabilita antibakteriální složky v matrici. Stabilita chlorhexidinu v připraveném organovermikulitu byla v této práci hodnocena s ohledem na možné budoucí využití tohoto organo-anorganického hybridního materiálu s antibakteriálními vlastnostmi v oblasti dentální medicíny. Mimo běžné podmínky ( $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) byly simulovány také podmínky, při kterých lidské tělo bojuje se zánětem, kdy teplota se zvyšuje a zároveň dochází k poklesu  $\text{pH}$  ( $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 2$ ). Na základě výsledků analýzy TOC, kdy nedošlo k výraznému úbytku uhlíku a tedy i CA ve vzorcích, bylo potvrzeno, že antibakteriální chování vzorků před i po testu stability bylo téměř stejné. Pouze pro kmen *E. faecalis* byl u vzorku VER\_CA/7, 40 a VER\_CA/7, L při  $\text{pH} = 7$  nástup antibakteriálního účinku až po 24 h působení, kdežto u ostatních dvou kmenů nastal účinek již po 30 min. Výjimkou byl kmen *P. aeruginosa*, který opět projevil vysokou antibakteriální odolnost vůči testovaným vzorkům. Výsledkem této studie je potvrzení, že úbytek CA ze vzorku je minimální, a tudíž nemá vliv na konečné antibakteriální působení vzorku. Stabilita a dlouhodobé antibakteriální účinky vermikulitů s interkalovaným chlorhexidinem jsou velmi důležité vlastnosti pro případné využití materiálu v praxi. Námi získané pozitivní výsledky by mohly být využity při přípravě vzorků s postupným a dlouhodobým uvolňováním, např. v oblasti dentálního lékařství.

Posledním článkem této práce bylo nastínění praktického využití připravených práškových organovermikulitů jako nanoplňiva v PE nanokompozitních deskách. Práškový organovermikulit byl tavením zamíchán do PE matrice, přičemž z této taveniny byly následně vylišovány PE desky. U všech vylišovaných desek bylo zjištěno, že s rostoucím obsahem nanoplňiva a delší dobou působení roste také antibakteriální účinnost nanokompozitu. Antibakteriální účinnost těchto nanokompozitních desek byla stanovována tiskovou metodou vůči bakteriálnímu kmeni *S. aureus* a *E. coli*. Univerzálním vzorkem odolným vůči gram-pozitivním i gram-negativním bakteriálním kmenům byl NaVER\_CA/PE. Ostatní vzorky vykazovaly různou účinnost vůči vybraným kmenům. Zajímavé výsledky byly získány pro vzorky ZnVER\_CA/PE a VER\_CA/PE, kde tyto vzorky měly přesně opačný antibakteriální efekt vůči *E. coli* a *S. aureus*.

Bakterie jsou velice specifické organismy, které dle předložených výsledků, různě reagovaly na jednotlivé vzorky. Shrnutím jednotlivých studií dojdeme k závěru, že pokud známe podmínky, tzn., proti kterým bakteriálním kmenům má vzorek působit, či jaká doba působení je žádaná, lze připravit přesně definovaný vzorek, který bude vyhovovat nastaveným parametrům. Pokud však přesné složení bakteriálních kontaminantů nebudeme znát, je třeba zvolit přípravu univerzálního vzorku, kdy předpokládáme jakési univerzální působení proti nežádoucím bakteriím. Ze získaných výsledků vyplynulo, že vzorky připravené ve formě prášků a také PE desky vykazovaly dlouhodobou antibakteriální účinnost vůči testovaným bakteriálním kmenům, s výjimkou specifické bakterie *P. aeruginosa*. Důležitým zjištěním o dlouhodobém účinku těchto materiálů je zejména také dobrá stabilita organické složky CA v anorganickém vermikulitovém nosiči. Tyto vlastnosti jsou požadovány nejen v oblastech medicíny ale také i v průmyslu.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WEISS, Z., KUŽVART, M. *Jílové minerály: Jejich nanostruktura a využití*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0868-5.
- [2] BARABASZOVÁ, K. *Nanotechnologie a nanomateriály*. Ostrava: VŠB - Technical University Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1210-X.
- [3] PABST W., K. R. Prehistory of clay mineralogy - from ancient times to Agricola *Acta Geodyn. Geomater.*, 2009, vol. 153, 87-100.
- [4] GUGGENHEIM, S., T., M. R. Definition of clay and clay mineral: Joint report of the AIPEA nomenclature and CMS nomenclature committees. *Clays and Clay Minerals*, 1995, vol. 43, 255 - 256.
- [5] VALÁŠKOVÁ, M. *Vybrané vrstevnaté silikáty a jejich modifikované nanomateriály*. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012. ISBN 978-80-7204-811-3.
- [6] BRIGATTI, M. F., GALAN, E., THENG, B. K. G., Chapter 2 Structures and Mineralogy of Clay Minerals, in: B.K.G.T. Faïza Bergaya, L. Gerhard (Eds.) *Developments in Clay Science*, Elsevier2006, pp. 19-86.
- [7] ČÍČEL, B. *Mineralógia a kryštalochémia ílov*. 1. vyd. ed. Veda: Bratislava, 1981. ISBN
- [8] Dostupné z:  
<http://www.quasargroupconsulting.com/Encyclopedia/EarthScience/Geology/SoilMineralsPlantNutrition.php> [cit. 9.3.2017].
- [9] MARTIN, R. T., BAILEY, S. W., EBERL, D. D., FANNING, D. S., GUGGENHEIM, S., KODAMA, H., PEVEAR, D. R., SRODON, J., WICKS, F. J. Report of the Clay Minerals Society Nomenclature Committee; Revised classification of clay materials. *Clays and Clay Minerals*, 1991, vol. 39, 333-335.
- [10] LAGALY, G., Layer charge determination by alkylammonium ions., in: A.R. Mermut (Ed.) *Layer Charge Characteristics of 2:1 Silicate Clay Minerals*, The Clay Minerals Society, Boulder, Colorado, USA, 1994, pp. 1-46.
- [11] BERGAYA, F., LAGALY, G., VAYER, M., Cation and anion exchange, in: F. Bergaya, B.K.G. Theng, G. Lagaly (Eds.) *Handbook of clay science*, Elsevier2006, pp. 979-1001.
- [12] Dostupné z: [https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz\\_cast.pl?cast=71347](https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=71347) [cit. 9.3.2017].
- [13] MUIAMBO, H. F. *Inorganic modification of Palabora vermiculite*. Pretoria, 2011. Dissertation thesis na University of Pretoria.

- [14] MAQUEDA, C., ROMERO, A. S., MORILLO, E., PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L. Effect of grinding on the preparation of porous materials by acid-leached vermiculite. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 2007, vol. 68, 1220-1224.
- [15] PALANIANDY, S., AZIZLI, K. A. M. Mechanochemical effects on talc during fine grinding process in a jet mill. *International Journal of Mineral Processing*, 2009, vol. 92, 22-33.
- [16] VALÁŠKOVÁ, M., BARABASZOVÁ, K., HUNDÁKOVÁ, M., RITZ, M., PLEVOVÁ, E. Effects of brief milling and acid treatment on two ordered and disordered kaolinite structures. *Applied Clay Science*, 2011, vol. 54, 70-76.
- [17] MAQUEDA, C., PEREZ-RODRIGUEZ, J. L., ŠUBRT, J., MURAFÁ, N. Study of ground and unground leached vermiculite. *Applied Clay Science*, 2009, vol. 44, 178-184.
- [18] WANG, L., CHEN, Z., WANG, X., YAN, S., WANG, J., FAN, Y. Preparations of organo-vermiculite with large interlayer space by hot solution and ball milling methods: A comparative study. *Applied Clay Science*, 2011, vol. 51, 151-157.
- [19] HONGO, T., YOSHINO, S., YAMAZAKI, A., YAMASAKI, A., SATOKAWA, S. Mechanochemical treatment of vermiculite in vibration milling and its effect on lead (II) adsorption ability. *Applied Clay Science*, 2012, vol. 70, 74-78.
- [20] DINTER, O. *Drcení a mletí nerostných surovin*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1984. ISBN
- [21] ŠTENGL, V., ŠUBRT, J. Výkonový ultrazvuk a jeho aplikace. *Chemické Listy*, 2004, vol. 98, 324-327.
- [22] PÉREZ-MAQUEDA, L. A., HARO, M. C. J. D., POYATO, J., PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L. Comparative study of ground and sonicated vermiculite. *Journal of Materials Science*, 2004, vol. 39, 5347-5351.
- [23] NGUYEN, A. N., REINERT, L., LÉVÊQUE, J. M., BEZIAT, A., DEHAUDT, P., JULIAA, J. F., DUCLAUX, L. Preparation and characterization of micron and submicron-sized vermiculite powders by ultrasonic irradiation. *Applied Clay Science*, 2013, vol. 72, 9-17.
- [24] ALI, F., REINERT, L., LEVÊQUE, J.-M., DUCLAUX, L., MULLER, F., SAEED, S., SHAH, S. S. Effect of sonication conditions: Solvent, time, temperature and reactor type on the preparation of micron sized vermiculite particles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, vol. 21, 1002-1009.
- [25] REINHOLDT, M. X., HUBERT, F., FAUREL, M., TERTRE, E., RAZAFITIANAMAHARAVO, A., FRANCIUS, G., PRÊT, D., PETIT, S., BÉRÉ, E.,

- PELLETIER, M., FERRAGE, E. Morphological properties of vermiculite particles in size-selected fractions obtained by sonication. *Applied Clay Science*, 2013, vol. 77–78, 18-32.
- [26] JIMÉNEZ DE HARO, M. C., PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L., POYATO, J., PÉREZ-MAQUEDA, L. A., RAMÍREZ-VALLE, V., JUSTO, A., LERF, A., WAGNER, F. E. Effect of ultrasound on preparation of porous materials from vermiculite. *Applied Clay Science*, 2005, vol. 30, 11-20.
- [27] MARCOS, C., RODRÍGUEZ, I. Exfoliation of vermiculites with chemical treatment using hydrogen peroxide and thermal treatment using microwaves. *Applied Clay Science*, 2014, vol. 87, 219-227.
- [28] UDOUDO, O., FOLORUNSO, O., DODDS, C., KINGMAN, S., URE, A. Understanding the performance of a pilot vermiculite exfoliation system through process mineralogy. *Minerals Engineering*, vol.
- [29] GUGGENHEIM S., B. F., Brigatti M.F., Galán E. Drits V., Formoso M.L.L., Kogure T., Stanjek H. Report of the AIPEA Nomenclature Committee for AIPEA Newsletter. *Aipea Newsletter*, 2012, vol. 44, 53-54.
- [30] VALÁŠKOVÁ, M., MARTYNKOVÁ, G. S. *Clay Minerals in Nature - Their Characterization, Modification and Application*. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0738-5.
- [31] VENUGOPAL, B. R., SEN, S., SHIVAKUMARA, C., RAJAMATHI, M. Delamination of surfactant intercalated smectites in alcohols: Effect of chain length of the solvent. *Applied Clay Science*, 2006, vol. 32, 141-146.
- [32] KOMADEL, P., MADEJOVÁ, J., Chapter 7.1 Acid Activation of Clay Minerals, in: B.K.G.T. Faïza Bergaya, L. Gerhard (Eds.) *Developments in Clay Science*, Elsevier 2006, pp. 263-287.
- [33] TEMUJIN, J., OKADA, K., MACKENZIE, K. J. D. Preparation of porous silica from vermiculite by selective leaching. *Applied Clay Science*, 2003, vol. 22, 187-195.
- [34] HE, H., DUCHET, J., GALY, J., GERARD, J.-F. Grafting of swelling clay materials with 3-aminopropyltriethoxysilane. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, vol. 288, 171-176.
- [35] MANSOORI, Y., ATGHIA, S. V., ZAMANLOO, M. R., IMANZADEH, G., SIROUSAZAR, M. Polymer–clay nanocomposites: Free-radical grafting of polyacrylamide onto organophilic montmorillonite. *European Polymer Journal*, 2010, vol. 46, 1844-1853.
- [36] LIU, X., WU, Q. PP/clay nanocomposites prepared by grafting-melt intercalation. *Polymer*, 2001, vol. 42, 10013-10019.



- [37] LIN, H.-C., HSIEH, B.-Z., LIN, Y.-L., SHENG, Y.-J., LIN, J.-J. Effect of grafting architecture on the surfactant-like behavior of clay-poly(NiPAAm) nanohybrids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, vol. 387, 106-114.
- [38] WILLIAMS-DARYN, S., THOMAS, R. K. The Intercalation of a Vermiculite by Cationic Surfactants and Its Subsequent Swelling with Organic Solvents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, vol. 255, 303-311.
- [39] DA FONSECA, M. G., ALMEIDA, R. K. S., ARAKAKI, L. N. H., ESPINOLA, J. G. P., AIROLDI, C. Vermiculite as a useful host for guest cyclic aliphatic amine intercalation, followed by cation adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, vol. 280, 39-44.
- [40] WILLIAMS-DARYN, S., THOMAS, R. K., CASTRO, M. A., BECERRO, A. I. The distribution of toluene in intercalation complexes of a vermiculite and alkyl trimethylammonium bromides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, vol. 267, 265-271.
- [41] Dostupné z: <http://www.upce.cz/fcht/slchpl/vyzkum/interkalacni.html> [cit. 16.6.2015].
- [42] YANG, D., YUAN, P., ZHU, J. X., HE, H. P. Synthesis and characterization of antibacterial compounds using montmorillonite and chlorhexidine acetate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2007, vol. 89, 847-852.
- [43] PINNAVAIA, T. J., HALL, P. L., CADY, S. S., MORTLAND, M. M. Aromatic radical cation formation on the intracrystal surfaces of transition metal layer lattice silicates. *Journal of Physical Chemistry*, 1974, vol. 78, 994-999.
- [44] LAGALY, G., OGAWA, M., DÉKÁNY, I., Chapter 7.3 Clay Mineral Organic Interactions, in: B.K.G.T. Faïza Bergaya, L. Gerhard (Eds.) *Developments in Clay Science*, Elsevier 2006, pp. 309-377.
- [45] OGAWA, M., HASHIZUME, T., KURODA, K., KATO, C. Intercalation of 2,2'-bipyridine and complex formation in the interlayer space of montmorillonite by solid-solid reactions. *Inorganic Chemistry*, 1991, vol. 30, 584-585.
- [46] WU, N., WU, L., LIAO, L., LV, G. Organic intercalation of structure modified vermiculite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, vol. 457, 264-271.
- [47] PUFFR RUDOLF, B. J. Nanokompozoty polyamidů s vrstevnatými silikáty. *Chemické Listy*, 2010, vol. 104, 138-146.
- [48] JIMÉNEZ DE HARO, M. C., MARTÍNEZ BLANES, J. M., POYATO, J., PÉREZ-MAQUEDA, L. A., LERF, A., PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L. Effects of mechanical treatment

- and exchanged cation on the microporosity of vermiculite. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 2004, vol. 65, 435-439.
- [49] MUIAMBO, H. F., FOCKE, W. W., ATANASOVA, M., DER WESTHUIZEN, I. v., TIEDT, L. R. Thermal properties of sodium-exchanged palabora vermiculite. *Applied Clay Science*, 2010, vol. 50, 51-57.
- [50] MARCOS, C., RODRÍGUEZ, I. Some effects of trivalent chromium exchange of thermo-exfoliated commercial vermiculite. *Applied Clay Science*, 2014, vol. 90, 96-100.
- [51] DA FONSECA, M. G., DE OLIVEIRA, M. M., ARAKAKI, L. N. H., ESPINOLA, J. G. P., AIROLDI, C. Natural vermiculite as an exchanger support for heavy cations in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, vol. 285, 50-55.
- [52] TERTRE, E., HUBERT, F., BRUZAC, S., PACREAU, M., FERRAGE, E., PRÊT, D. Ion-exchange reactions on clay minerals coupled with advection/dispersion processes. Application to  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange on vermiculite: Reactive-transport modeling, batch and stirred flow-through reactor experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2013, vol. 112, 1-19.
- [53] STEUDEL, A., EMMERICH, K. Strategies for the successful preparation of homoionic smectites. *Applied Clay Science*, 2013, vol. 75–76, 13-21.
- [54] VALASKOVA, M. CLAYS, CLAY MINERALS AND CORDIERITE CERAMICS - A REVIEW. *Ceramics-Silikaty*, 2015, vol. 59, 331-340.
- [55] WEISS, Z., VALVODA, V., CHMIELOVA, M. Dehydration and rehydration of natural Mg-vermiculite. *Geologica Carpathica*, 1994, vol. 45, 33-39.
- [56] FOLORUNSO, O., DODDS, C., DIMITRAKIS, G., KINGMAN, S. Continuous energy efficient exfoliation of vermiculite through microwave heating. *International Journal of Mineral Processing*, 2012, vol. 114–117, 69-79.
- [57] MARCOS, C., ARANGO, Y., RODRIGUEZ, I. X-ray diffraction studies of the thermal behaviour of commercial vermiculites. *Applied Clay Science*, 2009, vol. 42, 368-378.
- [58] KRČOVÁ, M. *Nanokompozitní organojílové materiály s antimikrobiální účinností*. Ostrava, 2015. 44. Bakalářská práce na VŠB-TU Ostrava.
- [59] Dostupné z: <http://www.chlorhexidinefacts.com/> [cit. 23.2.2017].
- [60] Dostupné z: <http://watsonnoke.com/chlorhexidine-acetate-cas-56-95-1/> [cit. 9.3.2017].
- [61] HAMPL, F., PALEČEK, J. *Farmakochemie*. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 80-708-0495-5.
- [62] IMFELD, T. Chlorhexidine-containing chewing gum. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin*, 2006, vol. 116, 476-483.
- [63] JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology* 2000, 1997, vol. 15, 55-62.

- [64] KRATOCHVÍL B., Š. V., Vojtěch D. *Úvod do studia materiálů*. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-568-4.
- [65] ALEXANDRE, M., DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2000, vol. 28, 1-63.
- [66] GALIMBERTI, M., Rubber Clay Nanocomposites, in: A. Boczkowska (Ed.) *Advanced Elastomers - Technology, Properties and Applications*, InTech, Rijeka, 2012, pp. Ch. 04.
- [67] FONG, N., SIMMONS, A., POOLE-WARREN, L. A. Antibacterial polyurethane nanocomposites using chlorhexidine diacetate as an organic modifier. *Acta Biomaterialia*, 2010, vol. 6, 2554-2561.
- [68] YANO, K., USUKI, A., OKADA, A., KURAUCHI, T., KAMIGAITO, O. Synthesis and properties of polyimide-clay hybrid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1993, vol. 31, 2493-2498.
- [69] MITTAL, V. *In-situ Synthesis of Polymer Nanocomposites*. Wiley, 2011. ISBN 9783527640119.
- [70] FAWAZ, J., MITTAL, V., Synthesis of Polymer Nanocomposites: Review of Various Techniques, *Synthesis Techniques for Polymer Nanocomposites*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA2014, pp. 1-30.
- [71] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [72] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- [73] Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.html?p=P035](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=P035) [cit. 27.3.2016].
- [74] Dostupné z: [http://casopis.vesmir.cz/files/obr/nazev/2008\\_392\\_02/type/html](http://casopis.vesmir.cz/files/obr/nazev/2008_392_02/type/html) [cit. 27.3.2016].
- [75] Dostupné z: <http://www.microbiologyinfo.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/> [cit. 27.3.2016].
- [76] AMBROŽOVÁ, J. Ř. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0.
- [77] Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92551.aspx> [cit. 29.3.2016].
- [78] BERNAL, P., ZLOH, M., TAYLOR, P. W. Disruption of d-alanyl esterification of *Staphylococcus aureus* cell wall teichoic acid by the  $\beta$ -lactam resistance modifier (–)-epicatechin gallate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, vol. 63, 1156-1162.

- [79] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- [80] MOGHADAS, L., SHAHMORADI, M., NARIMANI, T. Antimicrobial activity of a new nanobased endodontic irrigation solution: *In vitro* study. *Dental Hypotheses*, 2012, vol. 3, 142-146.
- [81] Dostupné z: <http://microvisionlabs.com/gallery/sem-images/> [cit. 16.6.2015].
- [82] HANCOCK, R. E. W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 1998, vol. 27, S93-S99.
- [83] FRALEY, C. D., RASHID, M. H., LEE, S. S., GOTTSCHALK, R., HARRISON, J., WOOD, P. J., BROWN, M. R., KORNBERG, A. A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, vol. 104, 3526-3531.
- [84] HERRERA, P., BURGHARDT, R. C., PHILLIPS, T. D. Adsorption of *Salmonella enteritidis* by cetylpyridinium-exchanged montmorillonite clays. *Veterinary Microbiology*, 2000, vol. 74, 259-272.
- [85] MENG, N., ZHOU, N.-L., ZHANG, S.-Q., SHEN, J. Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, vol. 382, 45-49.
- [86] HE, H., YANG, D., YUAN, P., SHEN, W., FROST, R. L. A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and Chlorhexidini Acetas. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, vol. 297, 235-243.
- [87] SAHA, K., BUTOLA, B. S., JOSHI, M. Synthesis and characterization of chlorhexidine acetate drug–montmorillonite intercalates for antibacterial applications. *Applied Clay Science*, 2014, vol. 101, 477-483.
- [88] AMBROGI, V., PIETRELLA, D., NOCCHETTI, M., CASAGRANDE, S., MORETTI, V., DE MARCO, S., RICCI, M. Montmorillonite–chitosan–chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, vol. 491, 265-272.
- [89] HOLEŠOVÁ, S., SAMLÍKOVÁ, M., PAZDZIORA, E., VALÁŠKOVÁ, M. Antibacterial activity of organomontmorillonites and organovermiculites prepared using chlorhexidine diacetate. *Applied Clay Science*, 2013, vol. 83–84, 17-23.

- [90] HOLEŠOVÁ, S., VALÁŠKOVÁ, M., PLEVOVÁ, E., PAZDZIORA, E., MATĚJOVÁ, K. Preparation of novel organovermiculites with antibacterial activity using chlorhexidine diacetate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, vol. 342, 593-597.
- [91] HOLEŠOVÁ, S., ŠTEMBÍREK, J., BARTOŠOVÁ, L., PRAŽANOVÁ, G., VALÁŠKOVÁ, M., SAMLÍKOVÁ, M., PAZDZIORA, E. Antibacterial efficiency of vermiculite/chlorhexidine nanocomposites and results of the in vivo test of harmlessness of vermiculite. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, vol. 42, 466-473.
- [92] XU, D. F., DU, L. H., MAI, W. J., CAI, X., JIANG, Z. Y., TAN, S. Z. Continuous release and antibacterial activity of chlorhexidine acetate intercalated vermiculite. *Materials Research Innovations*, 2013, vol. 17, 195-200.
- [93] ONNAINTY, R., ONIDA, B., PÁEZ, P., LONGHI, M., BARRESI, A., GRANERO, G. Targeted chitosan-based bionanocomposites for controlled oral mucosal delivery of chlorhexidine. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, vol. 509, 408-418.
- [94] WU, Y., ZHOU, N., LI, W., GU, H., FAN, Y., YUAN, J. Long-term and controlled release of chlorhexidine–copper(II) from organically modified montmorillonite (OMMT) nanocomposites. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, vol. 33, 752-757.
- [95] VERRAEDT, E., PENDELA, M., ADAMS, E., HOOGMARTENS, J., MARTENS, J. A. Controlled release of chlorhexidine from amorphous microporous silica. *Journal of Controlled Release*, 2010, vol. 142, 47-52.
- [96] LEUNG, D., SPRATT, D. A., PRATTEN, J., GULABIVALA, K., MORDAN, N. J., YOUNG, A. M. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, 7145-7153.
- [97] FARKAS, E., KISS, D., ZELKÓ, R. Study on the release of chlorhexidine base and salts from different liquid crystalline structures. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, vol. 340, 71-75.
- [98] YOUNG, A. M., NG, P. Y. J., GBURECK, U., NAZHAT, S. N., BARRALET, J. E., HOFMANN, M. P. Characterization of chlorhexidine-releasing, fast-setting, brushite bone cements. *Acta Biomaterialia*, 2008, vol. 4, 1081-1088.
- [99] NIGMATULLIN R., G. F., Konovalova V. Polymer-layered silicate nanocomposite in the design of antimicrobial materials. *Journal of material science*, 2008, vol. 43, 5728-5733.
- [100] PONGPRAYOON T., N. R., Zanutet N. Antimicrobial resistance of clay polymer nanocomposites. *Applied Clay Science*, 2013, vol. 86, 179-184.

- [101] HUNDÁKOVÁ, M., TOKARSKÝ, J., VALÁŠKOVÁ, M., SLOBODIAN, P., PAZDZIORA, E., KIMMER, D. Structure and antibacterial properties of polyethylene/organo-vermiculite composites. *Solid State Sciences*, 2015, vol. 48, 197-204.
- [102] KNEIFLOVÁ, J. Hodnocení baktericidní účinnosti dezinfekčních prostředků suspenzní mikrometodou. *Čs. epidemiologie, mikrobiologie a imunologie*, 1988, vol. 37, 97-104.
- [103] CHMIELARZ, L., RUTKOWSKA, M., JABŁOŃSKA, M., WĘGRZYN, A., KOWALCZYK, A., BORÓŃ, P., PIWOWARSKA, Z., MATUSIEWICZ, A. Acid-treated vermiculites as effective catalysts of high-temperature N<sub>2</sub>O decomposition. *Applied Clay Science*, 2014, vol. 101, 237-245.
- [104] MARCOS, C., ARANGO, Y. C., RODRIGUEZ, I. X-ray diffraction studies of the thermal behaviour of commercial vermiculites. *Applied Clay Science*, 2009, vol. 42, 368-378.
- [105] BEYER, J., VON REICHENBACH, H. G. An extended revision of the interlayer structures of one- and two-layer hydrates of Na-vermiculite. *Clay Minerals*, 2002, vol. 37, 157.
- [106] SKIPPER, N. T., SPOSITO, G., CHOU CHANG, F.-R. Monte Carlo simulation of interlayer molecular structure in swelling clay minerals; 2, Monolayer hydrates. *Clays and Clay Minerals*, 1995, vol. 43, 294.
- [107] HOLEŠOVÁ, S., ŠTEMBÍREK, J., BARTOŠOVÁ, L., PRAŽANOVÁ, G., VALÁŠKOVÁ, M., SAMLÍKOVÁ, M., PAZDZIORA, E. Antibacterial efficiency of vermiculite/chlorhexidine nanocomposites and results of the in vivo test of harmlessness of vermiculite. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 2014, vol. 42, 466-473.
- [108] HU, H., ZHANG, W., QIAO, Y., JIANG, X., LIU, X., DING, C. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO<sub>2</sub> coatings on titanium. *Acta Biomaterialia*, 2012, vol. 8, 904-915.
- [109] BARABASZOVÁ, K. Č., VALÁŠKOVÁ, M. Characterization of vermiculite particles after different milling techniques. *Powder Technology*, 2013, vol. 239, 277-283.
- [110] STAWIŃSKI, W., FREITAS, O., CHMIELARZ, L., WĘGRZYN, A., KOMĘDERA, K., BŁACHOWSKI, A., FIGUEIREDO, S. The influence of acid treatments over vermiculite based material as adsorbent for cationic textile dyestuffs. *Chemosphere*, 2016, vol. 153, 115-129.
- [111] RITZ, M., ZDRÁLKOVÁ, J., VALÁŠKOVÁ, M. Vibrational spectroscopy of acid treated vermiculites. *Vibrational Spectroscopy*, 2014, vol. 70, 63-69.
- [112] RUSSEL J. D., F. A. R. *Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods*. London: Chapman & Hall, 1994. ISBN

- [113] FARMER, V. C. *The infrared spectra of minerals*. London: The mineralogical Society, 1974. ISBN
- [114] SILVERSTEIN, R. M., BASSER, G. C., MORRILL, T. C. *Spectrometric identification of organic compounds*. second ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1991. ISBN
- [115] SOCRATES, G. *Infrared and Rman characteristic group frequencies, Table and Charts*. Third ed. Chichester: John Wiley & Sons Inc., 2001. ISBN
- [116] HOLEŠOVÁ, S., SAMLÍKOVÁ, M., PAZDZIORA, E., VALÁŠKOVÁ, M. Antibacterial activity of organomontmorillonites and organovermiculites prepared using chlorhexidine diacetate. *Applied Clay Science*, 2013, vol. 83–84, 17-23.
- [117] WALKER, G. F. Mechanism of dehydration of Mg-vermiculite. *Clays and Clay Minerals*, 1956, vol. 4, 101-115.
- [118] SIMHA MARTYNKOVÁ, G., VALÁŠKOVÁ, M., ČAPKOVÁ, P., MATĚJKA, V. Structural ordering of organovermiculite: Experiments and modeling. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, vol. 313, 281-287.
- [119] AFRAMIAN, D. J., DAVIDOWITZ, T., BENOLIEL, R. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Diseases*, 2006, vol. 12, 420-423.
- [120] RADOVIC-MORENO, A. F., LU, T. K., PUSCASU, V. A., YOON, C. J., LANGER, R., FAROKHZAD, O. C. Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS Nano*, 2012, vol. 6, 4279-4287.
- [121] HOTTA, S., PAUL, D. R. Nanocomposites formed from linear low density polyethylene and organoclays. *Polymer*, 2004, vol. 45, 7639-7654.

## 6 SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

### Články v impaktovaných časopisech

Samlíková M., Holešová S., Hundáková M., Pazdziora E., Jankovič L., Valášková M. Preparation Of Antibacterial Chlorhexidine/Vermiculite And Release Study. International Journal Of Mineral Processing, Feb 2017, 159, 1-6.

Hlaváč D., Samlíková M., Hundáková M. Molecular Modeling Of Antibacterial Clay Nanocomposites. Advanced Science Letters, Mar 2016, 22(3), 666-669.

Hundáková, M., Pazourková L., Kupková J., Samlíková M., Pazdziora E. Preparation Of Antimicrobial Polyethylene/Inorgano-Organo-Vermiculite Hybrid Material. Journal Of Nanoscience And Nanotechnology, Aug 2016, 16(8), 7783-7787.

Holešová S., Samlíková M., Ritz M., Pazdziora E. Antibacterial Polyethylene/Clay Nanocomposites Using Chlorhexidine As Organic Modifier. Materials Today-Proceedings, 2015, 2(1), 246-252.

Holešová S., Štembírek J., Bartošová L., Pražanová G., Valášková M., Samlíková M., Pazdziora E. Antibacterial Efficiency Of Vermiculite/Chlorhexidine Nanocomposites And Results Of The In Vivo Test Of Harmlessness Of Vermiculite. Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications, Sep 2014a, 42, 466-473.

Holešová S., Valášková M., Hlaváč D., Madějová J., Samlíková M., Tokarský J., Pazdziora E. Antibacterial Kaolinite/Urea/Chlorhexidine Nanocomposites: Experiment And Molecular Modelling. Applied Surface Science, Jun 2014b, 305, 783-791.

Holešová S., Samlíková M., Pazdziora E., M. Valášková. Antibacterial Activity Of Organomontmorillonites And Organovermiculites Prepared Using Chlorhexidine Diacetate. Applied Clay Science, Oct 2013, 83-84, 17-23.

### Články v recenzovaných časopisech

Samlíková M., Holešová S., Pazdziora E., Valášková M. Antibacterial activity of organovermiculites with variously modified surface area. *Journal of Nanocomposites and Nanoceramics*. 2012, vol. 3, no. 1, p. 29 – 33.



Hundáková M., Valášková M., Samlíková M., Pazdziora E., Slobodian P., Kimmer D.: Antibacterial effect of Ag, Cu-vermiculite filler in polyethylene. *Advanced Science, Engineering and Medicine – v recenzním řízení*

#### **Články ve sborníku ve světově uznávané databázi**

Samlíková M., Valášková M., Pazdziora E., Matějová K. Antibacterial Activity Of Chlorhexidine/Natural Mg-Vermiculite And Chlorhexidine/Cation Exchanged Vermiculites. Nanocon 2011, 2011, 635-639.

Samlíková M., Holešová S., Pazdziora E., Valášková M. Influence Of Mechanical And Chemical Treatment Of Vermiculite On Resulting Antibacterial Activity Of Organovermiculites. Nanocon 2012, 4th International Conference, 2012, 601-605.

Hlaváč D., Tokarský J., Holešová S., Samlíková M., Valášková M.. Structure Characterization Of The Antibacterial Chlorhexidine/Kaolinite Composite. Nanocon 2013, 5th International Conference, 2014, 626-631.

Samlíková M., Holešová S., Valášková M., Hundáková M., Pazdziora E., Kimmer D. Antibacterial Vermiculite-Chlorhexidine/Polyethylene Nanocomposites. Nanocon 2013, 5th International Conference, 2014, 614-619.

Hundáková, M., Samlíková M., Pazdziora E. Antibacterial Cerium-Montmorillonite And Cerium-Vermiculite. Nanocon 2014, 6th International Conference, 2015, 633-638.

Pazourková L., Drobíková K., Reli M., Simha Martynková G., Preparation of smooth polyethylene and polyethylene / organovermiculite surface. Nanocon 2015, 7th International Conference on Nanomaterials - Research & Application, 2015, vol. 454-459.

#### **Články ve sborníku**

Samlíková M.: Preparation of organoclays with antibacterial properties, *Den interních doktorandů FMFI*, Vysoká škola báňská - Technická univerzita, Ostrava, 2010. p. 167 – 170, ISBN 978-80-248-2344-7.

**Abstrakty v konferenčních sbornících**

Samlíková M., Holešová S.: Preparation of organoclays with antibacterial properties. In NanoOstrava 2011: Ostrava, duben 2011. p. 95, ISBN 978-80-7329-264-5.

Samlíková M., Pazdziora E., Matějová K., Valášková M.: Antibacterial activity of chlorhexidine/natural Mg-vermiculite and chlorhexidine/cation exchanged vermiculites In Nanocon 2011: Brno, září 2011. p. 105, ISBN 978-80-87294-23-9.

Samlíková M., Holešová S., Valášková M., Pazdziora E. – Influence of mechanical and chemical treatment of vermiculite on resulting antibacterial activity of organovermiculites. In Nanocon 2012: Brno, říjen 2012. p. 118, ISBN 978-80-87294-32-1.

Holešová S., Samlíková M., Valášková M., Pazdziora E. Antibacterial properties of chlorhexidine/urea/kaolinite nanocomposites. In NanoOstrava 2013: Ostrava, červen 2013. p. 111, ISBN 978-80-7329-361-1.

Hundáková M., Valášková M., Samlíková M., Pazdziora E., Slobodian P., Kimmer D.: Antibacterial effect of Ag, Cu-vermiculite filler in polyethylene. In NanoOstrava 2013: Ostrava, červen 2013. p. 41 – 42, ISBN 978-80-7329-361-1.

Holešová S., Mamulová Kutláková K., Samlíková M., Pazdziora E. Antibacterial organoclays prepared using chlorhexidine digluconate. In CMLM 2013: Saint-Petersburg, září 2013. p. 112.

Hlaváč D., Tokarský J., Holešová S., Samlíková M., Valášková M. Structure characterization of the antibacterial chlorhexidine/kaolinite composite. In Nanocon 2013: Brno, říjen 2013. p. 119, ISBN 978-80-87294-44-4.

Samlíková M., Holešová S., Valášková M., Hundáková M., Pazdziora E., Kimmer D. Antibacterial vermiculite-chlorhexidine/polyethylene nanocomposites. In Nanocon 2013: Brno, říjen 2013. p. 118, ISBN 978-80-87294-44-4.

### **Účast na projektech**

GA ČR 10/11/2215 – Studium a hodnocení struktur vermikulitů modifikovaných ve funkci nanoplniv a podložek

SP2011/158 - Modifikované jílové minerály pro specifické nanokompozity II

SP2012/43 – Modifikované jílové minerály jako funkční plniva polymerních a keramických kompozitů

SP2013/78 – Vybrané vrstevnaté silikáty a jejich aplikace v polymerních a keramických nanokompozitech

Centrum excellence IT4Innovations projekt reg. č. cz. 1.05/1.1.00/02.0070

### **Výuka**

Chemie (9360-0005/01)

Nanotechnologie II – metody příprav nanočástic (9360-0124/01)

## 7 SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Klasifikace vybraných vrstevnatých silikátů (upraveno dle Martin a kol. [9]).....	11
Tab. 2. Velikost nejdůležitějších kationtů v půdě (kationt – černý, vodní obal – šrafovaný) [12].....	13
Tab. 3. CEC vybraných jílových minerálů [13]. ....	13
Tab. 4. MIC (% m/V) přírodního VER, iontově-vyměněných vermikulitů NaVER, ZnVER a jejich příslušných organovermikulitů VER_CA, NaVER_CA a ZnVER_CA.....	53
Tab. 5. MIC (% m/V) připravených organovermikulitů. ....	64
Tab. 6. Označení vzorků chlorhexidin/vermikulitu po procesu uvolňování. ....	67
Tab. 7. Obsah uhlíku (%) v jednotlivých vzorcích.....	69
Tab. 8. MIC (% m/V) připravených organovermikulitů. ....	70
Tab. 9. Poměry hmotností směsí pro přípravu nanokompozitních PE desek.....	77
Tab. 10 Průměrný počet CFU <i>S. aureus</i> v čase. ....	84
Tab. 11 Průměrný počet CFU <i>E. coli</i> v čase. ....	86

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Tetraedrická síť, $O_a$ – vrcholový kyslík, $O_b$ – bazální atomy kyslíku. Parametry $a$ , $b$ odpovídají základní ortogonální buňce $T_4O_{10}$ [6].	7
Obr. 2. Oktaedrické sítě: a) dioktaedrická síť, b) trioktaedrická síť [6].	7
Obr. 3. Schematické zobrazení spojení oktaedrické (O) a tetraedrické (T) sítě - vrstva 1:1	8
Obr. 4. Schematické zobrazení spojení oktaedrické (O) a dvou tetraedrických (T) sítí -	9
Obr. 5. Základní strukturní jednotka fylosilikátu s proměnlivým mezivrstevním materiálem [8].	10
Obr. 6. Obecné schéma procesu interkalace [41].	18
Obr. 7. Schematické zobrazení struktury vermikulitu [56].	22
Obr. 8. SEM snímek expandovaného vermikulitu prudce zahřátého na 1000 °C během 1 min [57].	23
Obr. 9. Strukturní vzorec chlorhexidinu diacetátu [60].	24
Obr. 10. Schéma syntézy chlorhexidinu, chlorhexidin diacetátu [61].	25
Obr. 11. Schéma působení chlorhexidinu na povrchu buňky [59].	26
Obr. 12. Schéma klasifikace struktur vrstevnatých polymerních kompozitů (převzato a upraveno dle [66]).	29
Obr. 13. Schéma organofilizace vermikulitu a jeho následná interkalace v polymeru [67].	30
Obr. 14. Schéma prokaryotické buňky typické pro bakterie [73].	32
Obr. 15. Diagnostické barvení: a) gram-pozitivní koky [74] a b) gram-negativní tyčinky [75].	32
Obr. 16. Schematické porovnání stavby bakteriální stěny gram-pozitivních a gram-negativních bakterií [75].	33
Obr. 17. Snímek SEM bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> [78].	34
Obr. 18. Snímek SEM bakterie <i>Enterococcus faecalis</i> [80].	35
Obr. 19 Snímek SEM bakterie <i>Escherichia coli</i> [81].	36
Obr. 20 Snímek SEM bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [83].	37
Obr. 21 Stanovení MIC vzorků na mikrotitračních deskách: a) ředění vzorku v glukózním základu (vždy tři jamky obsahují stejný vzorek), b) vzniklý zákal zobrazující bakteriální růst a zároveň antibakteriální účinnost vzorku.	46
Obr. 22 Inokulátor.	46
Obr. 23. Porovnání počítatelného (vpravo) a nepočítatelného (vlevo) množství vzniklých kolonií.	47

Obr. 24. Rtg záznamy přírodního VER, monoionních vermikulitů NaVER, ZnVER a jejich příslušných organovermikulitů VER_CA, NaVER_CA a ZnVER_CA. ....	50
Obr. 25. IČ spektrum chlorhexidin diacetátu. ....	51
Obr. 26. IČ spektra přírodního VER, iontově-vyměněných vermikulitů NaVER, ZnVER a jejich příslušných organovermikulitů VER_CA, NaVER_CA a ZnVER_CA. ....	52
Obr. 27. Porovnání antibakteriální účinnosti vzorků a) VER_CA, b) NaVER_CA a c) ZnVER_CA vůči jednotlivým bakteriálním kmenům v závislosti na době působení. ....	56
Obr. 28. Rtg difrakční záznamy a) vermikulitů po kulovém a tryskovém mletí a acidifikovaných vermikulitů, b) z nich připravených organovermikulitů.....	59
Obr. 29. IČ spektra a) mechanicky a chemicky upravených vermikulitů a b) z nich připravených organovermikulitů. ....	61
Obr. 30. Snímky SEM vermikulitu a) kulově mletého (VER), b) tryskově mletého (VERj), c) kulově mletého po aktivaci kyselinou (VERa) a d) tryskově mletého po aktivaci kyselinou (VERja). ....	63
Obr. 31 Porovnání antibakteriální účinnosti a) VER_CA, b) VERj_CA, c) VERa_CA a d) VERja_CA vůči jednotlivým bakteriálním kmenům v závislosti na době působení. ....	65
Obr. 32. Rtg difrakční záznamy vzorků vermikulitu a organovermikulitů před a po testu stability. ....	67
Obr. 33. IČ spektra organovermikulitů po procesu uvolňování za různých podmínek.....	68
Obr. 34 Porovnání antibakteriální účinnosti vzorků a) VER_CA, b) VER_CA/2, 40, c) VER_CA/2, L, d) VER_CA/7, 40 a e) VER_CA/7, L vůči jednotlivým bakteriálním kmenům v závislosti na době působení. ....	73
Obr. 35. Tavicí stroj Brabender s detailem hnětacího šneka. ....	75
Obr. 36 Ruční vodou chlazený lis. ....	76
Obr. 37. Fotografie vylisovaných VER_CA/PE desek s obsahem 3 %, 6 % a 10 % nanoplniva. ....	76
Obr. 38. Rtg záznamy přírodního VER, interkalovaného VER_CA a nanokompozitních VER_CA/PE desek.....	77
Obr. 39. Rtg difrakční záznamy NaVER, NaVER_CA a nanokompozitních PE desek. ....	78
Obr. 40. Rtg difrakční záznamy ZnVER, ZnVER_CA a nanokompozitních PE desek.....	79
Obr. 41. IČ spektra připravených nanokompozitních PE desek a) VER_CA/PE, b) NaVER_CA/PE, c) ZnVER_CA/PE s různým obsahem organovermikulitu a spektrum čistého PE. ....	81

Obr. 42. SEM snímky PE desek: a) 10% VER_CA/PE, b) 10% NaVER_CA/PE a c) 10% ZnVER_CA/PE. ....	82
Obr. 43 Fotografické znázornění postupného působení nanokompozitního plniva v čase. ....	85
Obr. 44 10% NaVER/PE a 10% NaVER_CA/PE po 24 hod expozice <i>E. coli</i> . ....	86
Obr. 45 Závislost počtu CFU <i>S. aureus</i> v přítomnosti jednotlivých vzorků v čase. ....	88
Obr. 46. Závislost počtu CFU <i>E. coli</i> v přítomnosti jednotlivých vzorků v čase. ....	88

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AIPEA	Mezinárodní Asociace pro studium jílu – <i>fran. Association Internationale Pour l'Étude des Argiles</i>
CA	Chlorhexidin diacetát
CCM	Česká sbírka mikroorganismů – <i>angl. Czech collection of microorganisms</i>
CEC	Kationtová výměnná kapacita – <i>angl. cation exchange capacity</i>
CFU	Počet formujících se jednotek – <i>angl. colony-forming units</i>
CMS	Jílová minerální společnost – <i>angl. Clay Minerals Society</i>
CPSD	Širokoúhlý pozičně citlivý detektor – <i>angl. Curved Position Sensitive Detector</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina – <i>angl. deoxyribonucleic acid</i>
DTGS	Deuterovaný triglycerinsulfát detektor
IČ	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací – <i>angl. Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
G <sup>-</sup>	Gramnegativní bakteriální kmen
G <sup>+</sup>	Grampozitivní bakteriální kmen
HDPE	Vysokohustotní polyetylen – <i>angl. High-density polyethylene</i>
HDTMA	Hexadecyltrimethylammonium
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii - <i>angl. International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KTJ	Kolonie tvořící jednotky – <i>angl. colony-forming units</i>
LD <sub>50</sub>	Smrtná (letální) dávka – <i>angl. lethal dose</i>
M1, M2, M3	Centrální pozice v oktaedru
MIC	Minimální inhibiční koncentrace – <i>angl. minimum inhibition concentration</i>
MMT	Montmorillonit
MRSA	Bakteriální kmen <i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní vůči antibiotiku meticilinu - <i>angl. methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NM	Nepočitatelné množství
PE	Polyetylen
PP	Polypropylen
PSI	Jednotka tlaku (1 PSI = 6 894,757 Pa)
PVA	Polyvinylalkohol
Rtg	Rentgenová prášková difrakce
SAV	Slovenská akademie věd



## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

---

SEM	Skenovací elektronová mikroskopie – <i>angl. scanning elektron microscopy</i>
TGA	Termogravimetrická analýza
TOC	Celkový organický uhlík – <i>angl. total organic carbon</i>
VER	Vermikulit